

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**“DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA
INMUNOGÉNICA DE ANTÍGENOS DE
ECHINOCOCCUS GRANULOSUS EN PERROS
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga

AUTOR

Elizabeth Sofía Astupiña Figueroa

ASESOR

César Miguel Gavidía Chucán

Lima – Perú

2013



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**Determinación de la Eficacia Inmunogénica de Antígenos de
Echinococcus granulosus en Perros Infectados
Experimentalmente**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGA
GENETISTA BIOTECNÓLOGA

Bach. Elizabeth Sofía Astupiña Figueroa

ASESOR INTERNO: Dr. César Miguel Gavidia Chucán

ASESOR EXTERNO: Dra. Manuela Verástegui Pimentel

Lima - Perú

2013

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	MARCO TEÓRICO.....	2
2.1.	DEFINICIÓN DE EQUINOCOCOSIS.....	2
2.2	AGENTE ETIOLÓGICO.....	2
2.3	ESTRUCTURA Y MORFOLOGÍA.....	6
2.4	CICLO BIOLÓGICO.....	13
2.5	EPIDEMIOLOGÍA.....	17
2.6	MEDIDAS DE CONTROL.....	20
2.7	PERSPECTIVA ACTUAL CONTRA LA EQUINOCOCOSIS.....	20
2.8	ADYUVANTE QUIL A E INOCULACIÓN NASAL.....	22
III.	HIPÓTESIS.....	26
IV.	OBJETIVOS.....	26
V.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
VI.	RESULTADOS.....	44
VII.	DISCUSIÓN.....	65
VIII.	CONCLUSIONES.....	72
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
X.	ANEXOS.....	82

RESUMEN

La equinococosis quística representa una grave zoonosis parasitaria en nuestro país y otros países en desarrollo dedicados a la ganadería. El agente causante es el céstodo *Echinococcus granulosus*, cuyo estadio adulto se desarrolla en el intestino delgado de hospederos definitivos (caninos) y el desarrollo del estadio larval se presenta principalmente en el hígado y pulmón de hospederos intermediarios como el ganado ovino. Una vacuna que proteja a los perros permitiría disminuir la biomasa parasitaria y la carga de huevos que infecta al rebaño. Por ello se evaluó la inmunoprotección contra *E. granulosus* empleando de antígenos de superficie como proteínas de membrana y productos metabólicos de excreción-secreción de protoescolices, y parásitos adultos. Las proteínas de membrana fueron obtenidas por extracción con Tritón x-114 y los productos de excreción/secreción (E/S) obtenidos por cultivo *in vitro* (Medio HAM F12). Además, se obtuvo antígeno total de la tenia adulta por sonicación. Se usó Quil A (50 µg/ml) como adyuvante. Los antígenos fueron administrados por vía intranasal y se emplearon 12 perros divididos en cuatro grupos de tratamiento: control, E/S, proteínas de membrana (PM) y proteína total. Los animales recibieron tres inmunizaciones en intervalos de 15 días; se enfrentaron con 150000 protoescolices viables por vía oral, 15 días después de la última inmunización. Los perros fueron sacrificados entre 49-53 días después del enfrentamiento. Se evaluó la carga parasitaria y la presencia de huevos. Los grupos E/S y PM tuvieron menor carga parasitaria y ausencia de huevos en comparación al control, aunque no hubo diferencia estadística significativa. Los resultados muestran la posibilidad de continuar estudios con estos antígenos, ya que la inhibición del desarrollo embrionario es crucial para detener la transmisión a hospederos intermediarios y al hombre.

Palabras clave: *Echinococcus granulosus*, protoescolix, inmunización, antígeno excretorio-secretorio, equinococosis quística.

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dándome ánimo y acompañándome en los momentos de crisis y de felicidad.

Agradezco a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por haberme dado cobijo y por las lecciones que aprendí en ella, al Dr. César Gavidia por haber confiado en mi persona, por la paciencia y por la dirección de este trabajo y a la Dra. Manuela Verástegui por los consejos, el apoyo y el ánimo que me brindó.

Gracias también a mis queridos amigos, a mis padres y hermanos que de forma incondicional, entendieron mis ausencias y mis malos momentos.

Gracias también a Dios por ser mi guía y fortaleza espiritual.

Gracias a todos.

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres, Alfredo y Esther, como un testimonio de cariño y eterno agradecimiento por mi existencia, valores morales y formación profesional. Porque sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y porque nunca podré pagar todos sus desvelos, ni aún con las riquezas más grandes del mundo. Por lo que soy y por todo el tiempo que les robé pensando en mí...

A mis amigos, porque sin ellos no hubiera sido lo mismo.

LISTA DE ABREVIATURAS

PSC = Protoescólex.

PSC's = Protoescólices.

E/S= Excretorio/Secretorio.

PM= Proteína de membrana.

P.Mol.= Peso molecular.

EG= *Echinococcus granulosus*.

MALT= Tejido linfoide asociado a mucosa.

NALT= Tejido linfoide asociado a la nariz.

OVA= Ovoalbúmina.

AIF= Fluído Intestinal Artificial.

HAM F12= Mezcla de Nutrientes HAM F12

MEM= Medio Esencial Mínimo.

g= Gravedades

r.p.m. = Revoluciones por minuto.

Rf. = Movilidad relativa

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Rasgos útiles para la identificación de las especies de *Echinococcus*.

TABLA 2. Epidemiología molecular de la equinococosis quística en la producción de animales reportados en diferentes países de Sudamérica.

TABLA 3. Cuantificación de proteínas del antígeno E/S obtenido *in vitro* de PSC's.

TABLA 4. Características de los caninos infectados y cantidad de tenias adultas recuperadas.

TABLA 5. Cuantificación de proteínas del antígeno E/S obtenido *in vitro* de tenias adultas.

TABLA 6. Cuantificación de proteínas del antígeno de PM de tenia adulta.

TABLA 7. Cuantificación de proteínas del antígeno total de EG051 y EG052.

TABLA 8. Valores de Rf de bandas proteicas del marcador molecular del gel No.1.

TABLA 9. Viabilidad promedio de protoescolices para enfrentamiento de perros.

TABLA 10. Perros inmunizados (n=12) contra *E. granulosus* usando diferentes antígenos.

TABLA 11. Valores de la mediana de la carga parasitaria de perros inmunizados.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Parásito adulto de *E. granulosus*.

FIGURA 2. Diagrama del huevo de *E. granulosus*.

FIGURA 3. Esquema de una porción de quiste hidatídico de *E. granulosus*. MA: membrana adventicia, ML: membrana laminar, MG: membrana germinativa, VPj: vesícula prolífera joven, VPf: vesícula prolífera fértil, VPe: vesícula prolífera estéril, P: protoescólex.

FIGURA 4. Ciclo de vida de *E. granulosus*.

FIGURA 5. Epidemiología molecular global de *E. granulosus*. Las áreas grises indican los países donde la equinococosis quística ha sido reportada.

FIGURA 6. Representación esquemática de los compartimientos y composición celular de NALT. B, células B; T4, CD4+ de células T, T8, CD8+ células T; Mph1, Mph2 y Mph3, macrófagos positivos para ED1, ED2 y ED3 respectivamente; IDC, células dendríticas interdigitantes, FDC, células dendríticas foliculares, HEV, vénula endotelial alta; M, pliegues de células M.

FIGURA 7. Quistes hidatídicos hepáticos (a) y pulmonares (b) de ovinos infectados naturalmente, de gran tamaño, sin calcificación y con membranas translúcidas, típicas de quistes con protoescólices viables

FIGURA 8. Líquidos hidatídicos obtenidos de quistes pulmonares y hepáticos.

FIGURA 9. (a) Frascos de cultivo de 25 cm² conteniendo las muestras de PSC's y en la parte posterior las botellas con el medio HAM F12 y MEM (De izquierda a derecha). (b) Frascos de cultivo de 75 cm² empleados en la quinta extracción de PSC's.

FIGURA 10. Infección experimental de un canino con protoescólices de quistes hidatídicos, por vía oral.

FIGURA 11. Colocación de la muestra de tenia adulta dentro de una cubeta de hielo para la sonicación, empleando la punta mediana.

FIGURA 12. Aplicación de ketamina por vía intravenosa en el perro EG067.

FIGURA 13. Inmunización del perro EG073 por vía intranasal, empleando una jeringa tuberculina cargada con el antígeno E/S (PSC's + tenia adulta).

FIGURA 14. Flujoograma de la metodología empleada.

FIGURA 15. (A) y (B) Protoescólices invaginados de la primera extracción debido a que se omitió el tratamiento enzimático con (AIF).

FIGURA 16. (A) Campo de Protoescólices (PSC's) invaginados y evaginados de la segunda extracción en medio MEM. (B) protoescólex de la tercera extracción en medio HAM F12.

FIGURA 17. Protoescólices (PSC's) evaginados de la segunda extracción en medio MEM, con presencia de ganchos en el medio.

FIGURA 18. (A) Protoescólices evaginados de la quinta extracción en medio HAM F12 suplementado. (B) Protoescólices con presencia de vesícula en el polo posterior.

FIGURA 19. Vesícula con múltiples PSC's evaginados de la quinta extracción en medio HAM F12 suplementado.

FIGURA 20. Tenias de *E. granulosus* del cuarto perro (EG052) al tercer día de cultivo. (A) Tenia en medio de cultivo HAM F12 y (B) Tenia en medio de cultivo MEM.

FIGURA 21. Tenias de *E.granulosus* del tercer perro (EG051) en proceso de degeneración después del quinto día de cultivo. (A) Tenia en medio HAM F12 y (B) Tenia en medio MEM.

FIGURA 22. Gel No.1 patrón de bandas de las PM de protoescólex por deoxicolato de sodio y Tritón x-114.

FIGURA 23. Ecuación de la recta obtenida a partir del marcador molecular del gel No.1.

FIGURA 24. Gel No.2 patrón electroforético de E/S de protoescólex y tenia adulta.

FIGURA 25. Gel No.3 patrón electroforético de las PM de tenia.

FIGURA 26. Gel No.4 patrón electroforético del antígeno total.

FIGURA 27. Medición con ocular micrométrico del largo de las tenias obtenidos del perro EG060 tratado con PM.

FIGURA 28. Presencia de huevos maduros provenientes del proglótido grávido de las tenias del perro control EG059.

FIGURA 29. (A) Presencia de huevos inmaduros en sobrenadante de las tenias del perro EG071 tratado con proteína total; (B) presencia de huevos maduros en sobrenadante de perro control EG072.

FIGURA 30. Carga parasitaria de perros inmunizados.

ABSTRACT

Cystic echinococcosis is a serious parasitic zoonosis in our country and other developing countries dedicated to livestock. The causative agent is the tapeworm *Echinococcus granulosus*, whose adult stage takes place in the small intestine of definitive hosts (dogs) and the development of the larval stage occurs mainly in the liver and lung of intermediate hosts such as sheep. A vaccine to protect dogs would reduce the parasitic biomass and burden of eggs that infecting the flock. Therefore immunoprotección was evaluated against *E. granulosus* using surface antigens as membrane proteins and metabolic products of excretion-secretion protoscoleces and adult worms. Membrane proteins were obtained by extraction with Triton x-114 and the products of excretion/secretion (E/S) obtained by *in vitro* culture (Medium HAM F12). Furthermore, the total antigen obtained had grown by sonication. Quil A was used (50 µg/ml) as an adjuvant. The antigens were administered intranasally and 12 dogs were used divided into four treatment groups: control, E/S, membrane protein (PM) and total protein. Animals received three immunizations at 15 days intervals; protoscoleces faced viable 150000 orally, 15 days after the last immunization. The dogs were sacrificed between 49-53 days after challenge. Parasite load was evaluated and the presence of eggs. Groups E/S and PM had lower parasite load and absence of eggs compared to the control, although there was no statistically significant difference. The results show the possibility of continuing studies with these antigens, since inhibition of embryo development is critical to stop the transmission intermediate hosts and man.

Key Words: *Echinococcus granulosus*, protoscoleces, immunization, excretory-secretory antigen, cystic echinococcosis.

I. INTRODUCCIÓN

La Equinococosis quística es una enfermedad zoonótica de distribución geográfica mundial (Larrieu *et al.*, 2004), producida por un céstodo de la familia Taenidae, el *Echinococcus granulosus*. Tiene alta prevalencia en Argentina, Uruguay, Chile, Perú y el Sur de Brasil, produciendo grandes pérdidas para la ganadería y los sistemas de salud (Lightowlers *et al.*, 2000).

Se presenta en algunos departamentos de nuestro país de forma endémica donde se desarrolla principalmente la ganadería ovina (Moro *et al.*, 1997). Tiene una alta prevalencia en la Sierra Central y Sur del país, especialmente en los departamentos de Junín, Pasco, Puno y Arequipa, ocasionando grandes pérdidas económicas, debido al decomiso de las vísceras infectadas y la disminución en la producción de lana, leche y carne (Larrieu *et al.*, 2004).

El parásito requiere dos hospederos mamíferos para completar su ciclo de vida: el estadio adulto, que se desarrolla en el intestino del perro y de otros carnívoros (como el zorro y el perro), y el estadio larvario que se desarrolla en forma de quiste en las vísceras de animales ungulados, especialmente ganado ovino, caprino, bovino o porcino. En la materia fecal del perro se eliminan huevos que infectan al rebaño (Zhang *et al.*, 2008). Por ello, la vacunación de perros, como medida de control, es una estrategia que viene siendo investigada, aunque existen limitados y escasos estudios.

El objetivo de este trabajo es determinar la eficacia inmunogénica de antígenos de *E. granulosus* empleando Quil A como adyuvante, en perros infectados experimentalmente, para ello se empleó los productos de excreción/secreción (E/S) y las proteínas de membrana de la etapa larvaria (Protoescólex) y la etapa adulta (Tenia) de *E. granulosus*, así como proteínas totales del gusano adulto.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 DEFINICIÓN DE EQUINOCOCOSIS

Los términos hidatidosis y equinococosis son utilizados indistintamente para describir la zoonosis producida por céstodos del género *Echinococcus*, aunque el primero hace referencia a la enfermedad producida por la fase larvaria en los hospederos intermediarios y se reserva el término equinococosis a la infección del hospedador definitivo por el céstodo adulto (Armira, 2004), siendo los perros la fuente de infección de la enfermedad hidatídica para humanos (Reyes *et al.*, 2012).

La hidatidosis es estrictamente una zoonosis. El hombre contrae la infección de los cánidos; la transmisión es siempre cíclica, siendo imposible que se efectúe de hombre a hombre o de cualquier hospedero intermediario a otro (Armira, 2004).

2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

2.2.1 Situación Taxonómica

Taxonómicamente *Echinococcus sp.*, ha sido clasificado de la forma siguiente (Armira, 2004):

Phylum: Plantyhelminthes

Clase: Eucestoda

Orden: Taeniidea

Familia: Taeniidae

Género: *Echinococcus*

Especies: *E. granulosus*, *E. multilocularis*

E. oligarthrus y *E. vogeli*.

Desde el punto de vista taxonómico, se aceptan cuatro especies del género *Echinococcus* (Tabla 1), denominadas: *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus*, y *E. vogeli*; a pesar que hasta hace poco se añadió una nueva especie, *Echinococcus shiquicus*, a las ya conocidas, descubierta en el condado de Shiqu, en la República Popular China (Manual de la OIE, 2008).

TABLA 1. Rasgos útiles para la identificación de las especies de *Echinococcus* (Xiao *et al.*, 2006).

	<i>E. granulosus</i>	<i>E. multilocularis</i>	<i>E. oligarthrus</i>	<i>E. vogeli</i>	<i>E. shiquicus</i>
Distribución	Cosmopolita	Región holoártica	Región neotropical	Región neotropical	Meseta tibetana
Hospedador definitivo	Perros	Zorros	Felinos salvajes	Perro de monte	Zorro tibetano
Hospedador intermedio	Ungulados	Roedores microtinos	Roedores neotropicales	Roedores neotropicales	Pika de la meseta
Adulto					
Longitud del cuerpo (mm)	2.0–11.0	1.2–4.5	2.2–2.9	3.9–5.5	1.3–1.7
No. segmentos	2–7	2–6	3	3	2–3
Longitud de los ganchos grandes (µm)	25.0–49.0	24.9–34.0	43.0–60.0	49.0–57.0	20.0–23.0
Longitud de los ganchos pequeños (µm)	17.0–31.0	20.4–31.0	28.0–45.0	30.0–47.0	16.0–17.0
No. testículos	25–80	16–35	15–46	50–67	12–20
Posición del poro genital					
a. Segmento maduro	Cerca del centro	Anterior al centro	Anterior al centro	Posterior al centro	Cerca del borde superior
b. Segmento grávido	Posterior al centro	Anterior al centro	Cerca del centro	Posterior al centro	Anterior al centro
Útero grávido	Se ramifica lateralmente	En forma de bolsa	En forma de bolsa	Tubular	En forma de bolsa
Metacestodo	Quistes uniloculares en las vísceras	Quistes uniloculares en las vísceras	Quistes poliquísticos en los músculos	Quistes poliquísticos en las vísceras	Quistes uniloculares en las vísceras

En el caso de *E. granulosus* se han descrito distintas variantes interespecíficas e intraespecíficas, esta última es especialmente asociada a las diferentes áreas geográficas u hospederos intermediarios (Reus *et al.*, 1992). La variabilidad de *E. granulosus* previamente caracterizado en estudios fisiológicos, morfológicos y bioquímicos, que han

sido confirmados por diferentes técnicas moleculares, permitieron la identificación de 9 diferentes genotipos (G1-G9) (Rosenzvit *et al.*, 2006). Algunos genotipos de *E. granulosus* exhiben rasgos característicos que justificarían el reconocimiento como especies separadas de acuerdo con algunos autores, pero se necesitan estudios posteriores para definir el rango completo de la diversidad genética (Manual de la OIE, 2008).

Las especificidades de cepa de *E. granulosus* en los ciclos domésticos abarcan el perro y la oveja en la región mediterránea, Sudamérica (Argentina, Brasil, Chile, Perú y Uruguay), África (Etiopía, Kenia y Sudán), en Oriente medio y regiones orientales, Rusia, Asia central (Kazajistán, Kirguizistán y Uzbekistán), Mongolia, República Popular China, Oceanía y el Reino Unido; el perro y el caballo en Bélgica, Irlanda y Reino Unido; el perro y la vaca en Bélgica, Alemania, Sudáfrica y Suiza; el perro y el cerdo en Polonia; y el perro, el lobo y el reno en las regiones sub-árticas de Noruega, Finlandia y Alaska (Manual de la OIE, 2008).

Basados en el análisis de secuencias de nucleótidos del citocromo C oxidasa subunidad 1 mitocondrial (CO1) y genes deshidrogenasa 1(NADH), actualmente se distinguen 10 genotipos (G1-G10) de *E. granulosus*. Estos diferentes genotipos han sido asociados con distintos hospederos intermediarios (Sánchez *et al.*, 2010). Por ejemplo, en Sudamérica la presencia de estas distintas cepas de *E. granulosus*, incluyen la cepa ovina G1, cepa ovina tasmania G2, cepa vaca G5, cepa camello G6 y cepa porcina G7. Estas cepas pueden poseer períodos de prepatencia de diferente magnitud y diferente infectividad para el hombre, perfil de transmisión, y sensibilidad a agentes quimioterapéuticos (Larrieu *et al.*, 2004).

En Sudamérica (Tabla 2) se ha demostrado la presencia de muchas variantes de *E. granulosus*. En Argentina, G1 y G6 han sido aislados de humanos, G2 de ovejas y humanos, y G7 de cerdos. En Chile, estudios similares revelan variantes G1 y G6 en

humanos. Las variantes G1 y G6 han sido caracterizadas de humanos en Perú. El genotipo G1 ha sido también aislado de ovejas, cabras y vacas en Perú. La determinación de genotipos presentes en áreas endémicas de Perú, a partir de muestras de protoescolices y capa germinal, provenientes de quistes hidatídicos de vacas, ovejas y humanos, de las zonas de Junín, Puno, Huancavelica, Cuzco, Arequipa y Ayacucho, resultó que todos los aislados, independiente del hospedero, exhibían genotipo G1, hallazgo que debe considerarse en el desarrollo de estrategias de control en Perú (Sánchez *et al.*, 2010).

TABLA 2. Epidemiología molecular de la equinococosis quística en la producción de animales reportados en diferentes países de Sudamérica (Cardona y Carmena, 2012).

Country	Origin	No. isolates	Gene markers	Genotype frequency (%)
Argentina	Sheep	17	<i>cox1</i> and <i>mdh</i>	G1 (76.5%); G2 (23.5%)
	Sheep	NS	<i>cox1</i> and ITS1 DNA	G1 (100%)
	Sheep	16	<i>cox1</i>	G1 (93.7%); G3 (6.3%)
	Goats	3	<i>cox1</i> and <i>mdh</i>	G6 (100%)
	Goats	23	<i>cox1</i>	G1 (8.7%); G6 (91.3%)
	Cattle	20	<i>cox1</i> and <i>mdh</i>	G1 (70.0%); G2 (5.0%); G5 (25.0%)
	Cattle	25	<i>cox1</i> and <i>nad1</i>	G1 (100%)
	Pigs	28	<i>cox1</i> and <i>mdh</i>	G1 (14.3%); G7 (85.7%)
	Pigs	18	<i>cox1</i>	G7 (100%)
Brasil	Sheep	12	<i>cox1</i>	G1 (100%)
	Cattle	28	<i>cox1</i>	G1 (92.9%); G5 (7.1%)
	Cattle	638	<i>cox1</i>	G1 (56.6%); G5 (43.4%)
Mexico	Pigs	7	<i>cox1</i> and ITS1 DNA	G6-G7 (100%)
	Pigs	6	<i>cox1</i> , <i>nad1</i> and ITS1 DNA	G1 (16.7%); G7 (83.3%)
Peru	Sheep	32	<i>cox1</i> and <i>ef1a</i>	G1-G3 (100%)
	Sheep	41	<i>cox1</i>	G1 (100%)
	Goats	6	<i>cox1</i> and <i>ef1a</i>	G1 (16.7%); G6 (83.3%)
	Cattle	16	<i>cox1</i> and <i>ef1a</i>	G1-G3 (100%)
	Cattle	44	<i>cox1</i>	G1 (100%)
	Pigs	12	<i>cox1</i> and <i>ef1a</i>	G1 (33.3%); G7 (66.7%)
	Pigs	8	<i>cox1</i> and <i>nad1</i>	G1 (100%)
	Alpacas	4	<i>cox1</i> and <i>nad1</i>	G1 (50.0%); G7 (50.0%)

Cox1: subunidad 1 del citocromo C oxidasa mitocondrial; ef1: factor 1 elongación nuclear; ITS1: espaciador 1 ribosomal; nad1: subunidad 1 del NADH deshidrogenasa; mdh: malato deshidrogenasa citosólica.

2.3 ESTRUCTURA Y MORFOLOGÍA

2.3.1 Verme Adulto

El estadio adulto de *E. granulosus* parasita a perros y otros cánidos que actúan como huéspedes definitivos (Mondragon, 2003). Carecen de sistema digestivo por lo que se nutren por difusión a través de su superficie corporal especializada, el tegumento.

El parásito adulto se encuentra fijo fuertemente a la mucosa del intestino delgado del huésped, y a diferencia de otras especies pertenecientes a la familia Taeniidae, poseen un cuerpo plano y pequeño de 2 a 7 mm., en el cual se destacan tres regiones anatómicas bien diferenciadas: el escólex, el cuello y la estróbila (Figura 1) (Oyenard *et al.*, 2009; Mondragon, 2003; Reus *et al.*, 1992).

El escólex es un órgano de fijación altamente especializado ubicado en la parte anterior del individuo. Posee cuatro ventosas redondas que le permiten fijarse en las microvellosidades del duodeno del hospedero definitivo. El escólex también tiene dos rondas de ganchos pequeños (22-39 μm) y grandes (31-49 μm) (Armira, 2004) y otros más curvos, los cuales por su forma o tamaño, sirven para diagnóstico (Mondragon, 2003) y forman el llamado rostelo; también intervienen en la fijación pero sólo penetran superficialmente al epitelio mucoso. Cercano al rostelo se encuentra la llamada glándula rostelar cuya secreción se cree importante en la interacción con el hospedero; no ha sido caracterizada, aunque se sabe que es rica en cistina (Oyenard *et al.*, 2009).

El escólex se continua en un cuello, corto, delgado e insegmentado y es el que origina los proglótides (Reus *et al.*, 1992; Armira, 2004).

La estróbila consiste de tres a cuatro unidades reproductoras, proglótides, cada uno de los cuales posee órganos reproductores independientes. Siendo el penúltimo quien contiene un ovario bilobulado y alrededor de 50 testículos (Reus *et al.*, 1992). En los

individuos maduros, el último de los proglótides, el más ancho y largo, denominado proglótide grávido, ocupa casi la mitad de la longitud total del cuerpo, y es la única unidad reproductora madura. Se encuentra cargado de huevos siendo, estrictamente, un saco ovífero, con insaculaciones laterales bien desarrolladas (Oyenard *et al.*, 2009; Armira, 2004). La madurez sexual se alcanza entre 3 y 4 semanas, la producción de huevos comienza a los 28 días después de la ingestión de protoescólices (PSC's), esto dependerá de la cepa del parásito, el tiempo de maduración y la permanencia de la parasitación (Mondragon, 2003).

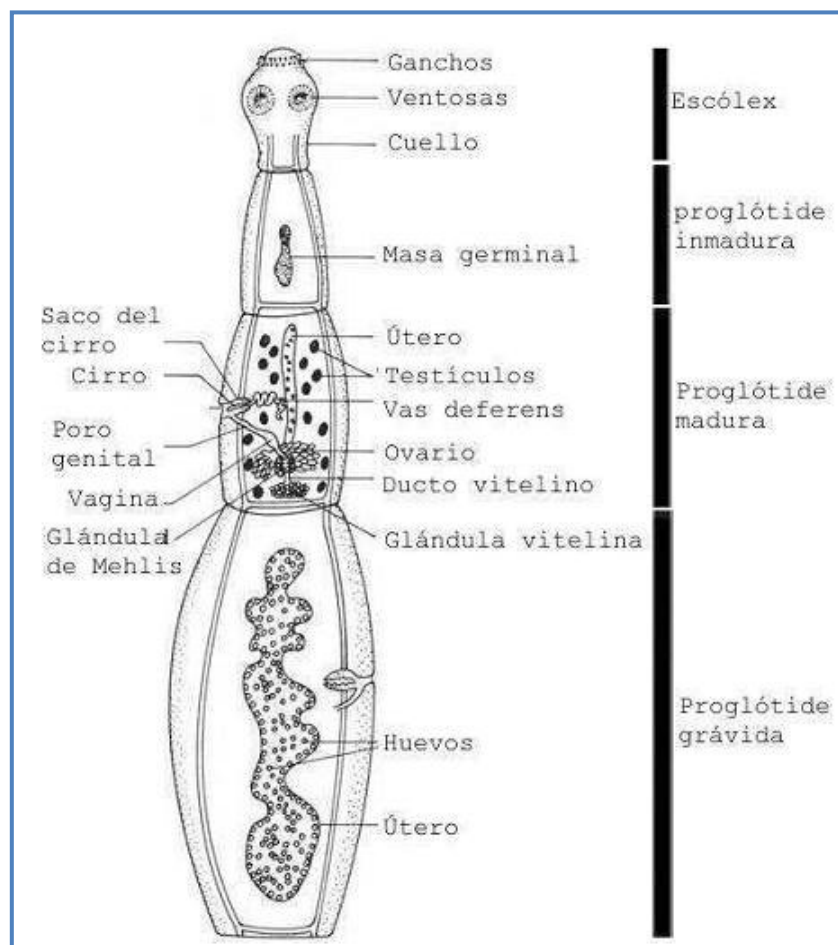


FIGURA 1. Parásito adulto de *E. granulosus* (Camicia, 2011).

2.3.2 Huevo

Los huevos fecundados, son de características ovoideas, de 30 - 50 μm de diámetro por 22- 44 μm , que tras un proceso de embriogénesis, desarrollaran un embrión hexacanto (oncósfera o primer estado larval), que contiene una estructura altamente diferenciada (Figura 2) y especializada: glándulas, fibras musculares y ganchos (Reus *et al.*, 1992) y se encuentran envueltos en varias membranas o capas (Larrieu *et al.*, 2004).

La capa principal es el embrióforo, constituido por 54 células que proporcionan protección física, ya que la capa vitelina (envoltura externa), se desprende del huevo antes de ser liberado. El embrióforo es relativamente grueso e impermeable y está formado por bloques poligonales compuestos por una proteína inerte, similar a la queratina, de alta resistencia que los mantiene unidos como sustancia cementante (Armira, 2004).

Los huevos son diseminados por el viento y los insectos, contaminando grandes extensiones de campo, el agua de arroyos y pozos de bebida, verduras, etc, pudiendo también permanecer adheridos a los pelos y ano del perro. Los huevos son, asimismo, muy resistentes a las condiciones climáticas pudiendo permanecer viables por un año en un amplio rango de temperatura (4 a 15°C). Por el contrario son sensibles a la desecación pudiendo morir en 4 días a una humedad ambiente de 0% o en 5 días a una temperatura de 60°C. Los huevos pueden llegar a desplazarse hasta 180 m del lugar de la defecación y pueden ser dispersados en áreas de hasta 30.000 ha. por dípteros y escarabajos coprófagos que actúan como transportadores (Larrieu *et al.*, 2004).

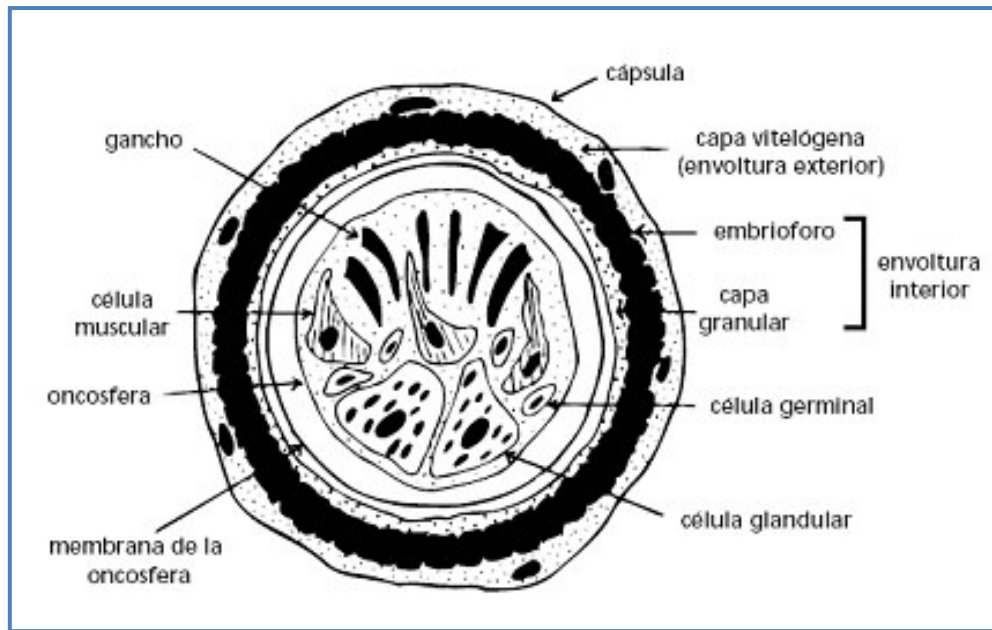


FIGURA 2. Diagrama del huevo de *E. granulosus* (Camicia, 2011).

2.3.3 Quiste hidatídico Madre

El quiste hidatídico o hidátide se considera un segundo estadio larvario, que se inicia en la oncosfera. Ésta sufrirá una serie de cambios de desdiferenciación, reabsorción y diferenciación de tejidos que, acompañados de un incremento de tamaño, dan lugar a una nueva forma estructural conocida como metacéstode o quiste hidatídico. Ésta crecerá expansivamente por alargamiento concéntrico entre 1-5 cm/año, dependiendo de la cepa, especie de hospedador y del grado de infección. Este desarrollo persiste lentamente y al quinto mes comienza a tomar forma, mide 1 cm de diámetro y se distinguen dos envolturas en su pared. A partir de este momento el crecimiento es rápido y hacia el séptimo u octavo mes adquiere un tamaño variable de varios centímetros y puede persistir hasta unos 50 años en el hombre (Armira, 2004).

En la cavidad quística se distingue una fina pared interna o membrana germinativa rodeada de un envoltura mas externa o membrana laminar que, *in vivo*, se encontrará rodeada por una envoltura fibrosa o membrana adventicia (Figura 3) (Reus *et al.*, 1992).

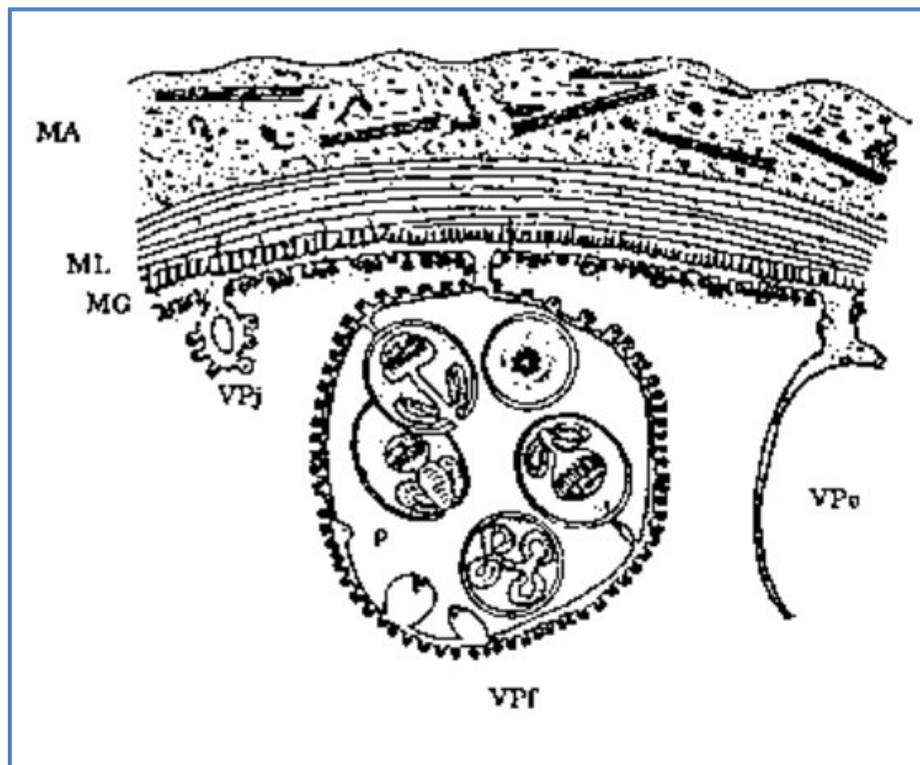


FIGURA 3. Esquema de una porción de quiste hidatídico de *E. granulosus*. MA: membrana adventicia, ML: membrana laminar, MG: membrana germinativa, VPj: vesícula proliferadora joven, VPf: vesícula proliferadora fértil, VPe: vesícula proliferadora estéril, P: protoescoléx (Reus *et al.*, 1992).

2.3.4 Vesículas prolíferas

En el interior del quiste y a partir del quinto mes se forma las vesículas prolíferas mediante proliferación asexual (Figura 3), a partir de las células indiferenciadas de la zona nuclear de la membrana germinativa. El proceso se inicia con la mitosis de células indiferenciadas y la acumulación de éstas en una determinada área (Reus *et al.*, 1992). Inicialmente, son como pequeñas masas nucleares o yemas que proliferan hacia el interior de la cavidad, crecen, se vacuolizan y quedan unidas a la capa germinal por un pequeño pedúnculo, además son visibles a simple vista (Mondragon, 2003). En su interior se repite el proceso asexual de gemación y da lugar a la formación de miles de protoescólex que aparecen hacia los 10-12 meses, por vesícula se originan de 10 a 50 PSC's (Armira, 2004).

2.3.5 Protoescólex

La formación de los protoescólex (Figura 3) suele originarse en un segundo proceso mitótico en las vesículas prolíferas aunque también pueden derivar directamente de la membrana germinativa del quiste. Células indiferenciadas se acumulan en la pared de las vesículas prolíferas, esta se invaginará hacia el interior y, arrastrará consigo las células indiferenciadas que progresivamente irán replicándose hasta definir todas las estructuras del protoescólex, el cual quedará unido a la pared de la vesícula por un fino pedículo (Reus *et al.*, 1992).

En el protoescólex evaginado se puede distinguir macroscópicamente dos regiones claramente diferenciadas: la región del escólex y la región del soma. La región del escólex está ocupada por cuatro ventosas y un róstelo armado con una doble corona de ganchos y generalmente se encuentra invaginada en la región del soma. El soma está ocupado básicamente por células del parénquima, corpúsculos calcáreos y el sistema excretor (Reus *et al.*, 1992).

El tegumento de los protoescólex es un sincitio de estructura muy similar al de la membrana germinativa, a través del cual se produce el intercambio de sustancias entre el parásito y su medio circundante (Reus *et al.*, 1992).

La mayor parte de la musculatura de los protoescólex se encuentra en la región del escólex, formando parte de las cuatro ventosas y anclado a ésta, la corona de ganchos que conforman el rostelo con 30 a 40 ganchos en dos hileras, una interna y otra externa; en la región del soma se puede distinguir, debajo del tegumento, fibras longitudinales y transversales responsables de los movimientos peristálticos del parásito (Reus *et al.*, 1992; Mondragon, 2003).

Los quistes que no contienen protoescólex reciben el nombre de acefaloquistes o quistes estériles. Su origen puede obedecer a que sean quistes demasiado jóvenes y se encuentren en fase de desarrollo o también por haberse desarrollado en hospedadores inadecuados. Por otra parte, los quistes con protoescólex son más grandes que los estériles, lo cual sugiere que la fertilidad de los mismos está asociada con un crecimiento rápido. Los quistes fértiles y viables tienen protoescólices vivos en, o sobre, la membrana prolífera y también en el líquido hidatídico, denominados “arenilla hidatídica” (Armira, 2004).

2.3.6 Líquido Hidatídico

Es el contenido líquido de un quiste hidatídico, vesícula prolífera. De no estar alterada la larva, es un líquido transparente. Su composición bioquímica es variable en función de la localización del quiste y el hospedador que los albergue. Contiene alrededor de 99.9% de agua y, su residuo seco está constituido básicamente por proteínas, hidratos de carbono, lípidos y sales (Reus *et al.*, 1992).

2.4 CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico de estos parásitos es indirecto con participación de dos hospederos mamíferos para completarse (Chabalgoity *et al.*, 1997), un hospedador definitivo en el cual el estadio adulto reside en el intestino delgado, y un hospedador intermediario en el cual la larva (quiste hidático o metacéstode) se instala generalmente en las vísceras (especialmente el hígado y los pulmones) (Figura 4). El hospedero definitivo habitual de *Echinococcus granulosus* es el perro como también otros cánidos, como coyotes o lobos (Mondragon, 2003; Delgado, 2009), mientras que son capaces de actuar como hospederos intermediarios numerosas especies tanto herbívoras como omnívoras; en particular el ganado ovino y con menos frecuencia el ganado vacuno, bovino, caprino, porcino y equino, a los que cabe añadir el hombre (Oyenard *et al.*, 2009; Armira, 2004; McManus *et al.*, 2003). El hombre constituye un hospedero intermediario accidental (Mondragon, 2003).

El desarrollo del céstode adulto en el hospedero definitivo ocurre tras la ingestión de quistes hidatídicos fértiles localizados en las vísceras de los hospederos intermediarios. Una vez ingeridos, la pared quística es digerida y se produce la liberación de numerosos protoescólices viables (Reus *et al.*, 1992). Las vesículas se liberan mediante la masticación y posteriormente son sometidas a la acción de la pepsina en el estómago. Por otra parte, ni la bilis, ni las enzimas específicas son imprescindibles, pero la tasa de evaginación aumenta en presencia de bilis y las condiciones aerobias son esenciales para ello. Aproximadamente un 86.5% de protoescólices evaginan en 6 horas. La evaginación completa puede durar 3 días y su actividad declina al cabo de unos 8 días (Armira, 2004).

A continuación, los protoescólex se fijan al epitelio intestinal mediante las ventosas y los ganchos, para evitar su desalojo y se desarrollan hasta llegar a vermes adultos, apareciendo limitados a una región concreta del intestino delgado. Las criptas de

Lieberkühn pueden representar un emplazamiento de particular significado nutricional para los equinococos maduros. Aunque no se conocen los factores que inducen al protoescólex evaginado a desarrollarse hasta verme adulto (Armira, 2004). Luego de la evaginación el metabolismo de los protoescólices aumenta, comenzando la síntesis de proteínas no estructurales, algunas de las cuales favorecen su establecimiento en el hospedero, y estructurales necesarias para su desarrollo a adultos. Para esto, los protoescólex poseen una rica reserva energética en forma de glicógeno la cual consumen rápidamente antes del establecimiento entre las microvellosidades del intestino delgado. Una vez establecidos, los protoescólex comienzan a nutrirse por difusión mediante el tegumento, cuyas células poseen extensiones citoplasmáticas en la región apical similares a microvellosidades llamadas microtricas. Estas modificaciones del tegumento aumentan la superficie de intercambio favoreciendo la absorción de nutrientes (Oyenard *et al.*, 2009).

El desarrollo hasta adulto incluye la diferenciación germinal y somática, que comprende inicialmente la formación y maduración de proglotis y posteriormente, el aumento de tamaño y segmentación de los mismos (estrobilación). Estos cuatro procesos tienen lugar independientemente (Armira, 2004).

Alrededor del día 30 post-infección (pi) comienza la producción de huevos. Una vez formado el proglotis grávido, se desprende del estróbilo y sale al exterior con las heces. No obstante, aproximadamente un 70% de los huevos se liberan en el intestino antes de que los proglotis grávidos salgan al exterior, por lo que después de abandonar el hospedador, sólo hay un 9% de huevos en los proglotis. Cuando son eliminados con las heces, la mayoría de los huevos están embrionados, los cuales envejecen por efecto del medio ambiente. Sólo las oncósferas maduras pueden desarrollarse como larvas (Armira, 2004).

La propagación a los hospederos intermediarios se realiza mediante huevos. Tras su ingesta, se produce la disolución de la cubierta del embrióforo en el estómago e intestino, para lo cual se requiere la acción de enzimas proteolíticas, y posteriormente se produce la activación de la oncósfera y liberación de su membrana. La oncósfera evagina sus tres pares de ganchos y mediante las glándulas de penetración (que lisan los tejidos y al mismo tiempo las protegen de las enzimas digestivas del hospedador), y los movimientos rítmicos del cuerpo, penetran en las criptas de las vellosidades del yeyuno e íleon superior, hasta alcanzar un pequeño vaso hemático o linfático, desde dónde llegan pasivamente a diversos órganos, generalmente por vía portal alcanza el parénquima hepático en donde se desarrollara la forma metacestódica (Reus *et al.*, 1992; Armira, 2004).

Una vez que las oncósferas alcanzan su lugar de elección, independientemente del camino seguido a partir de la mucosa intestinal, puede suceder que sean destruídas por la reacción celular, que mueran espontáneamente o que inicien su evolución vesicular para transformarse en un quiste hidatídico (Armira, 2004).

Al cuarto día de su instalación en el tejido, los embriones hexacantos miden 40µm y forman una cavidad en la masa del órgano parasitado. A los 10-14 días pi comienzan a reorganizarse mediante un proceso de proliferación celular, degeneración de los ganchos, atrofia muscular, vesiculización, formación de una cavidad central y desarrollo de las capas germinal y laminar, para dar lugar al metacéstodo o quiste hidatídico (Armira, 2004).

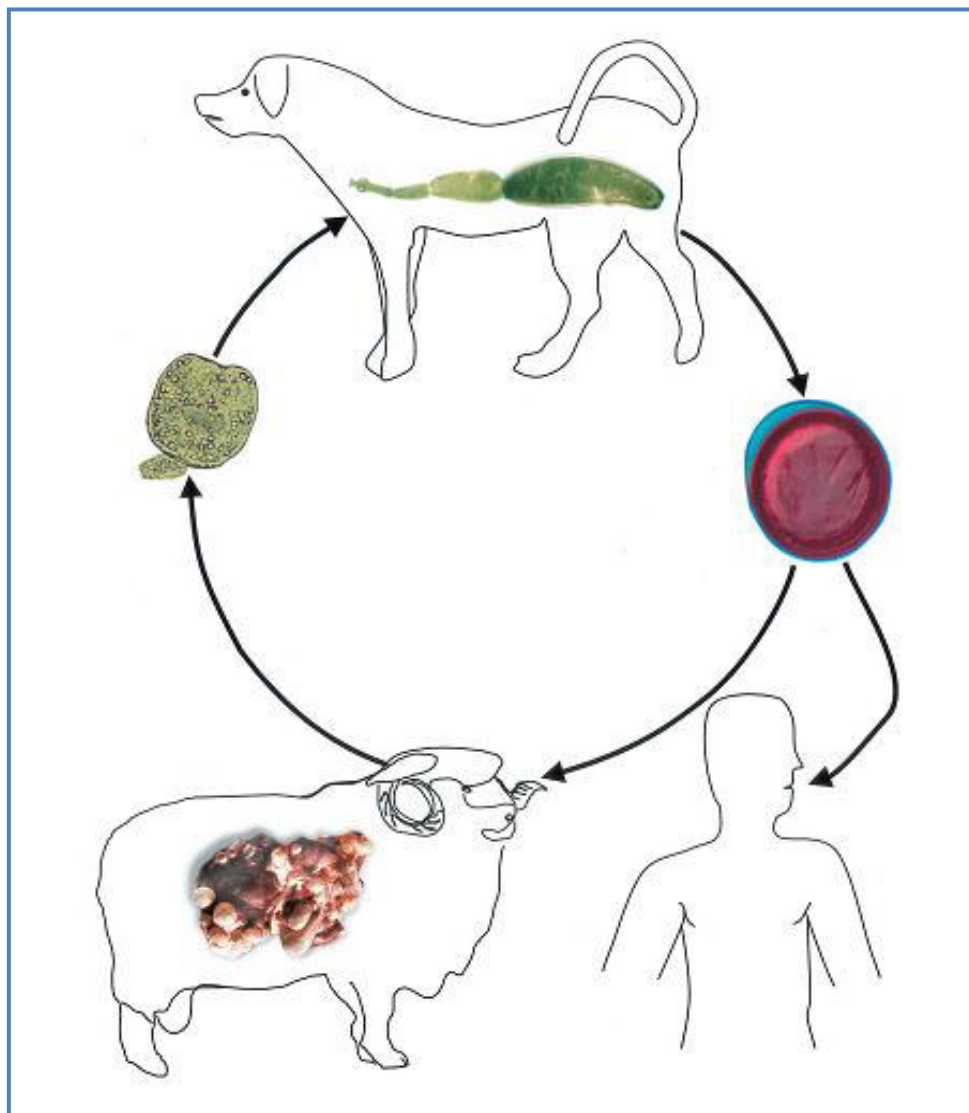


FIGURA 4. Ciclo de vida de *E. granulosus* (Zhang *et al.*, 2003).

2.5 EPIDEMIOLOGÍA

2.5.1 Rango geográfico y prevalencia

La equinococosis quística tiene una distribución geográfica en todo el mundo (Figura 5). La mayor prevalencia del parásito se encuentra en algunas partes de Eurasia, África, Australia y América del Sur. Dentro de las zonas endémicas, la prevalencia del parásito varía de esporádico a alto; pocos países pueden considerarse como libre de *E. granulosus* (Eckert *et al.*, 2001; Larrieu *et al.*, 2004).

La distribución cosmopolita de la equinococosis presenta variaciones geográficas en cuanto a tasas de incidencia y prevalencia se refiere. Las variaciones en la incidencia de la equinococosis se asocian a factores propios de cada país o región (ambientales, socio-ecológicos o intrínsecos al parásito o el huésped), que modulan la epidemiología de *E. granulosus* en su ciclo biológico doméstico (Reus *et al.*, 1992).

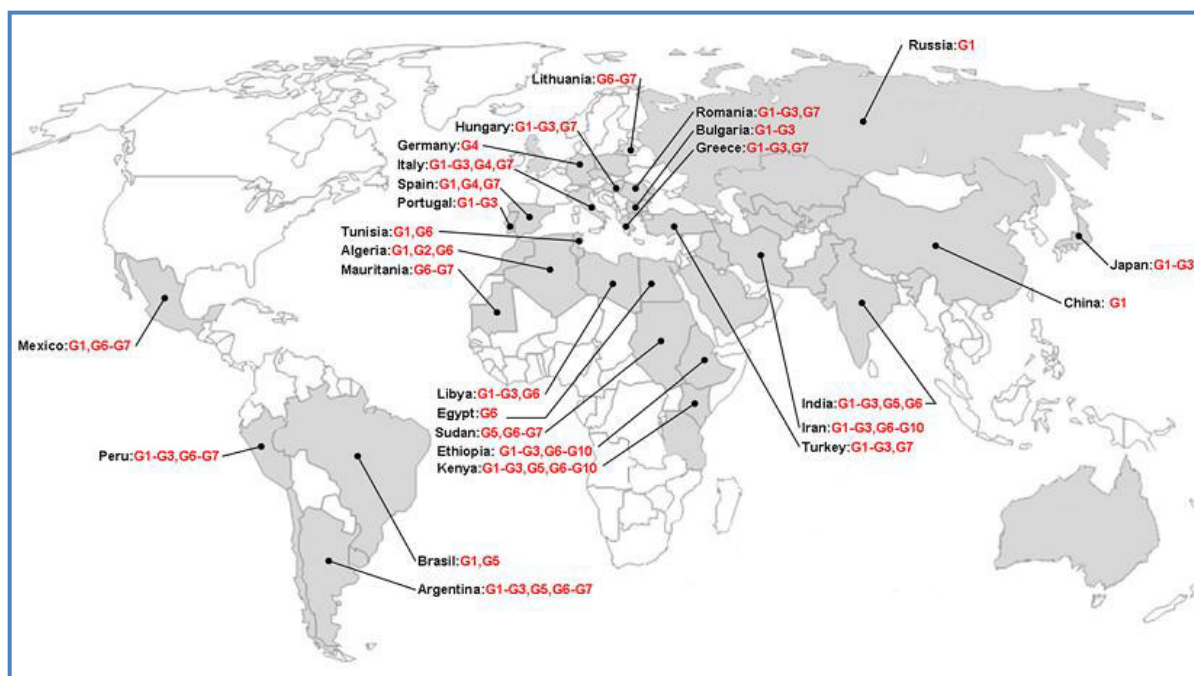


FIGURA 5. Epidemiología molecular global de *E. granulosus*. Las áreas grises indican los países donde la equinococosis quística ha sido reportada (Cardona y Carmena, 2012).

En América del Sur, las regiones más afectadas y con la más alta prevalencia por *E. granulosus* son: Argentina (Patagonia, Pampas, Costa); Bolivia (al sur-oeste del país); Brasil (Río Grande do Sul); Chile (el sur de las regiones centrales del valle, incluyendo la Antártica Chilena); Perú (parte central y sierra sur del país), Uruguay (todo el país). En las Islas Malvinas *E. granulosus* es endémica con una prevalencia baja (1993: 0,47% de las ovejas infectadas con quistes) (Eckert *et al.*, 2001).

2.5.2 Hospederos definitivos e intermediarios en Sudamérica

Esta enfermedad persiste gracias a la presencia de uno o varios hospederos definitivos y uno o varios hospederos intermediarios (Gavidia y De la Torre, 2002). La adaptabilidad de *E. granulosus* a diferentes hospederos y el intercambio de animales domésticos entre Europa y el resto del mundo ha hecho posible la distribución mundial de esta parasitosis (Reus *et al.*, 1992).

La tasa de prevalencia de equinococosis quística en la producción de animales, en los países de Sudamérica desde el 2000 hasta la fecha reportan que los quistes hidatídicos fueron encontrados en ovejas con una estimación promedio de prevalencia en Perú de 75%, 13.6% en Brasil, 9.8% en Uruguay, 9% en Argentina y 7.2% en Chile. Una prevalencia de 80% ha sido documentada en cabras de Perú, mientras un promedio de la tasa de infección de 12-20% ha sido reportada en bovinos en Argentina, Chile y Brasil (Cardona y Carmena, 2012).

2.5.3 Equinococosis canina e Hidatidosis en Perú

Tanto la equinococosis canina y la hidatidosis son comúnmente encontradas en comunidades rurales y zonas agrícolas, pero está presente también en las zonas urbanas, como se ha observado en Huancayo, Puno, Arequipa y Lima. En un estudio de una ciudad costera no endémica en Perú, se evaluó a los trabajadores de mataderos y perros callejeros de una misma área, encontrando que el 6.25% de equinococosis canina por examinación del contenido intestinal y 12% de hidatidosis por examinación serológica (Reyes *et al.*, 2012).

Lima, la capital de Perú, con una población de 8 millones de personas, es asumida por ser no endémica para equinococosis canina y la hidatidosis; pero el último reporte de prevalencia de equinococosis canina fue de 0.003% (Reyes *et al.*, 2012). A pesar que la infección canina puede ser menor al 1 % en Lima, la capacidad para infectar al hombre sería mayor; por ser un área de gran densidad demográfica, porque la tenencia de los perros en las viviendas es muy alta, y por el centralismo migracional en donde la mayor parte de esta migración proviene de la sierra y de las zonas endémicas (León *et al.*, 2007).

En un estudio de 8 mataderos informales, en un distrito periférico de Lima (Puente Piedra), se encontró 36% de prevalencia de equinococosis canina evaluada por coproELISA, y también 9,3% de prevalencia de hidatidosis por serología, demostrando la transmisión autóctona de *E. granulosus* en Lima, una gran metrópolis que supuestamente es no endémica. Estos resultados confirman el riesgo de mataderos informales, sin licencia, para la transmisión de hidatidosis urbana (Reyes *et al.*, 2012).

2.6 MEDIDAS DE CONTROL

Existen varias medidas de control que han sido aplicadas en programas pilotos y que vienen siendo implementadas en algunos países (Craig *et al.*, 2007). Dentro de las medidas de control más recientes se encuentra el uso de antiparasitarios, tales como el oxfendazol y praziquantel, los mismos que podrían ser de gran ayuda al disminuir el número de quistes fértiles o protoescolices viables en los hospederos intermediarios (Sato *et al.*, 1990; Gavidia *et al.*, 2009). Sin embargo, su aplicación dentro de un programa de control todavía requiere la realización de más estudios futuros.

Dentro de otras medidas recomendadas para el control del *Echinococcus granulosus* en el hospedero definitivo se puede mencionar el tratamiento de los perros con praziquantel a una dosis de 5 mg/Kg de peso, como la mejor medida de control en carnívoros (Zhang *et al.*, 2008), medida que muy difícilmente podría ser aplicada a la realidad peruana por los altos costos que representaría el tratar a los animales a lo largo del tiempo y sobre todo, que las personas no aceptan llevar a sus mascotas a tratamientos de manera tan continua. En este contexto, en la última década, algunos investigadores han iniciado a evaluar proteínas inmunogénicas como posibles candidatos vacunales en perros, sin embargo hasta la fecha no se ha demostrado ningún éxito (OIE, 2005).

2.7 PERSPECTIVA ACTUAL CONTRA LA EQUINOCOCOSIS

Una vacuna eficaz, tanto para el hospedero definitivo (perros) o el hospedero intermediario (oveja) podría ser una forma importante de romper el ciclo (Chabalgoity *et al.*, 1997).

2.7.1 Vacuna en el hospedero intermediario

En los hospederos intermediarios, se ha demostrado que el uso de antígenos recombinantes de la oncósfera de *E. granulosus*, tienen una eficacia superior al 90% (Lightowlers *et al.*, 2000). Por ejemplo la vacuna EG95, desarrollada en Australia y Nueva Zelanda, tiene eficacias de más del 98%, brinda protección de un año y se ha demostrado la transferencia pasiva de anticuerpos en las crías (Lightowlers y Heath, 2004). Uno de los problemas del uso de esta vacuna es el alto costo ya que en las zonas endémicas es difícil vacunar miles de cabezas de ganado.

2.7.2 Vacuna en el hospedero definitivo

El empleo de una vacuna que pueda proteger a los perros pastores contra estos parásitos puede directamente detener la producción de huevos infecciosos y, además, sería la medida más costo-beneficiosa para los países ganaderos (Chabalgoity *et al.*, 1997). Una vacuna expresada en *Salmonella* ha sido evaluada como potencial vacuna contra *E. granulosus* (Chabalgoity *et al.*, 2000). En Marruecos y Túnez se realizaron dos ensayos paralelos de posibles candidatos por vía oral en 28 perros. La vacuna fue preparada con dos proteínas recombinantes de gusanos adultos, una tropomiosina (EgTrp) y una proteína fibrilar similar a paramiosina (EgA31), clonada y expresada en una cepa atenuada de *Salmonella typhimurium*. Los perros vacunados recibieron dos dosis orales de la vacuna y fueron enfrentados 20 días después con 75.000 protoescolices viables. Se demostró disminución de la carga parasitaria en los perros vacunados (70% a 80%) y una tasa lenta de desarrollo en los gusanos restantes (Petavy *et al.*, 2008).

En Australia, han trabajado con proteínas solubles nativas aisladas de protoescolices, usando proteínas recombinantes (egM4, egM9 y egM123) derivadas de una familia de genes (egM) que regulan el desarrollo, expresados específicamente en gusanos adultos

maduros de *Echinococcus*. En comparación con los gusanos de los perros control, las 3 proteínas recombinantes presentaron un nivel de protección muy alto (97-100%) en términos de supresión del crecimiento y, especialmente, de desarrollo del huevo y la embriogénesis (Zhang *et al.*, 2006). Sin embargo, ninguno de estos estudios ha sido replicado nuevamente y tampoco brindaron una protección absoluta contra la instalación del gusano en el intestino de los caninos; adicionalmente, ambos estudios han sido criticados en cuanto a su diseño y validez estadística por otros investigadores (Zhang *et al.*, 2006 y Torgerson, 2008).

En un ensayo desarrollado en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, se infectaron experimentalmente 8/12 perros que fueron enfrentados a diferentes dosis (80000 a 308000 protoescolices), obteniéndose un amplio rango de parásitos adultos (1299 a 65000) luego de 30 días post- infección. Estos animales fueron re-infectados, hasta por 6 oportunidades, demostrándose una disminución en la carga parasitaria en subsecuentes infecciones. Esta respuesta protectora de los hospederos definitivos podría sugerir la intervención de antígenos de protoescolices involucrados en la estimulación de la respuesta inmune y la protección de los animales desafiados (Rosales *et al.*, 2008; Rossi *et al.*, 2012).

2.8 ADYUVANTE QUIL A E INOCULACIÓN NASAL

Quil A es una saponina que se obtiene de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* y es ampliamente utilizada como adyuvante en el campo veterinario, es de bajo costo, fácil de formular y generalmente seguro (Igarashi *et al.*, 2010).

Quil A se ha utilizado comercialmente en un vacuna veterinaria contra la fiebre aftosa, así como en algunas vacunas experimentales, como la formulación de la vacuna contra

Leishmania, el cual disminuyó el promedio de puntuaciones clínicas y aumentó el promedio de linfocitos CD4+ específica contra leishmania, en perros tratados con inmunoterapia, indicando el potencial inmunoterapéutico de esta vacunación sobre la leishmaniasis visceral canina (Santos *et al.*, 2007). Por otra parte, la toxicidad de Quil A la excluye del uso expandido en vacunas humanas, por su actividad hemolítica, ya que se une al colesterol de la membrana de los eritrocitos y los rompe (Sun *et al.*, 2009 y Aguilar, 2000).

Con respecto a la metodología de inoculación, estudios reportados utilizando el adyuvante de ISCOM's (cuyo componente principal es Quil A, colesterol y fosfolípidos) por vía oral, tiene el inconveniente principal de requerir grandes dosis de antígeno (5 a 10 veces más) que las inmunizaciones por vía parenteral (Mowat y Reid, 1995), sin embargo por vía intranasal se han logrado buenos resultados a bajas dosis, como los reportados por García *et al.*, (2007) quienes utilizaron el crudo de *T. gondii* *rhoptry* más Quil A por vía intranasal para evaluar el control de ooquistes arrojado en los gatos domésticos, y resultó que 2/3 no derramó oocistos después de haber sido inmunizados con tres dosis de la vacuna, y los gatos vacunados tenían una protección estimada de 65%.

Se ha utilizado también con éxito el adyuvante de ISCOM's contra *E. granulosus* para estimular la producción de anticuerpos por inmunización intranasal de ratones, mientras que en la misma dosis la producción de anticuerpos no fue registrado cuando el adyuvante de ISCOM se administró por vía oral (Carol *et al.*, 1997). Además factores como la degradación enzimática, la dilución del inmunógeno, así como las barreras físicas en el intestino pueden influir en la cantidad de antígeno que llega a los sitios de inducción. Esto hace que la vía intranasal podría ser una alternativa interesante para la inducción de la inmunidad local en el intestino delgado (Carol *et al.*, 1998).

La mucosa nasal es una importante arma del sistema inmune mucosal, ya que es a menudo el primer punto de contacto de los antígenos inhalados y en consecuencia, la inmunización intranasal ha emergido como una posible ruta de vacunación tanto para la inmunidad periférica y mucosal (Davis, 2001).

Existen múltiples razones que hacen atractiva la ruta intranasal:

- Fácilmente accesible
- Altamente vascularizado
- Presencia de numerosos microvellos que recubren el epitelio nasal y genera una larga superficie de absorción.
- Después de la inmunización intranasal tanto la respuesta inmune mucosal y sistémica pueden ser inducidas.

El epitelio que barre el tracto respiratorio puede contener cuatro diferentes tipos de células: macrófagos alveolares, células dendríticas, células M y linfocitos intraepiteliales. Además, el Tejido Linfoide Asociado a Mucosa (MALT) está organizado en estructuras foliculares y es encontrado principalmente en el tracto gastrointestinal y respiratorio. Una de las principales funciones de MALT es generar y diseminar células B sensibilizadas a antígeno, que se diferenciarán en la producción de células plasmáticas productoras de IgA en la lámina propia de varios sitios mucosales (Davis, 2001).

Dentro del tracto respiratorio, MALT es representado por NALT (Tejido Linfoide Asociado a la Nariz), el anillo de Waldeyer de la mucosa faríngea, y el Tejido Linfoide Asociado a los Bronquios (BALT) (Billen *et al.*, 2006).

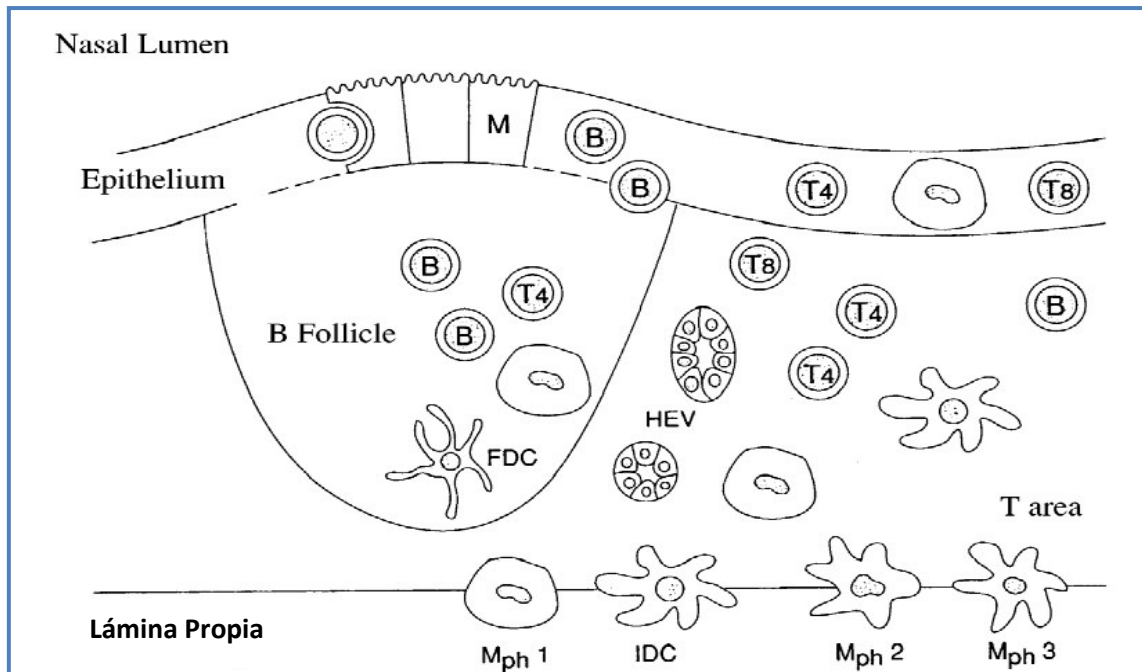


FIGURA 6. Representación esquemática de los compartimientos y composición celular de NALT. B, células B; T4, CD4+ de células T, T8, CD8+ células T; Mph1, Mph2 y Mph3, macrófagos positivos para ED1, ED2 y ED3 respectivamente; IDC, células dendríticas interdigitantes, FDC, células dendríticas foliculares, HEV, vénula endotelial alta; M, pliegues de células M, (Davis, 2001).

El anillo de Waldeyer en los perros incluye las amígdalas linguales (en la base de la lengua), las amígdalas palatinas y las amígdalas faríngeas o adenoides (Billen *et al.*, 2006). Las amígdalas contienen agregados de células linfoides y estos son similares a los de la placa de Peyer en el intestino (Davis, 2001).

El NALT consiste en áreas de células T y B que son cubiertas por la capa epitelial conteniendo micropliegues de células M (Figura 6). La estructura microvascular y esta correlación con los subconjuntos de linfocitos en NALT y son similares a otros tejidos linfoides asociados a mucosas tales como las amígdalas y las placas de Peyer (Davis, 2001).

III. HIPÓTESIS

H1: Al menos uno de los tres antígenos de *E. granulosus* conferirá protección a los perros infectados experimentalmente.

H0: Ninguno de los tres antígenos de *E. granulosus* conferirá protección a los perros infectados experimentalmente.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la eficacia inmunogénica de antígenos de *E. granulosus* empleando Quil A como adyuvante, en perros infectados experimentalmente.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Obtener antígenos de excreción- secreción, Proteínas de membrana de protoescoléx y del parásito adulto de *E. granulosus*, y Proteína total del parásito adulto.

4.2.2 Inmunizar perros por vía intranasal con antígenos de excreción- secreción y Proteínas de membrana de protoescoléx y del parásito adulto, y Proteína total del parásito adulto de *E. granulosus*.

4.2.3 Evaluar el grado de protección que confiere la inmunización con antígenos de excreción- secreción, Proteínas de membrana y Proteína total de *E. granulosus* en perros infectados experimentalmente.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Obtención de antígenos de *E. granulosus*

5.1.1 Obtención de Quistes Hidatídicos

Los quistes hidatídicos fueron obtenidos de ovinos infectados naturalmente, procedentes de zonas endémicas, sacrificados en los distintos camales de Lima y de la SAIS Túpac Amaru (Pachacayo – Huancayo).

Las vísceras que se escogieron, hígado y pulmón, son aquellas en dónde se observó una mayor cantidad de quistes (Figura 7); de éstos últimos se seleccionaron aquellos que presentaron un mayor tamaño (más de 1cm de diámetro aproximadamente) y se desecharon los degenerados, con calcificación y aquellos donde el líquido hidatídico presentaron un aspecto turbio, lo cual es indicador de contaminación con bacterias. Los quistes seleccionados fueron lavados y transportados en contenedores hipotérmicos al laboratorio donde fueron procesados dentro de las 18- 24 horas.

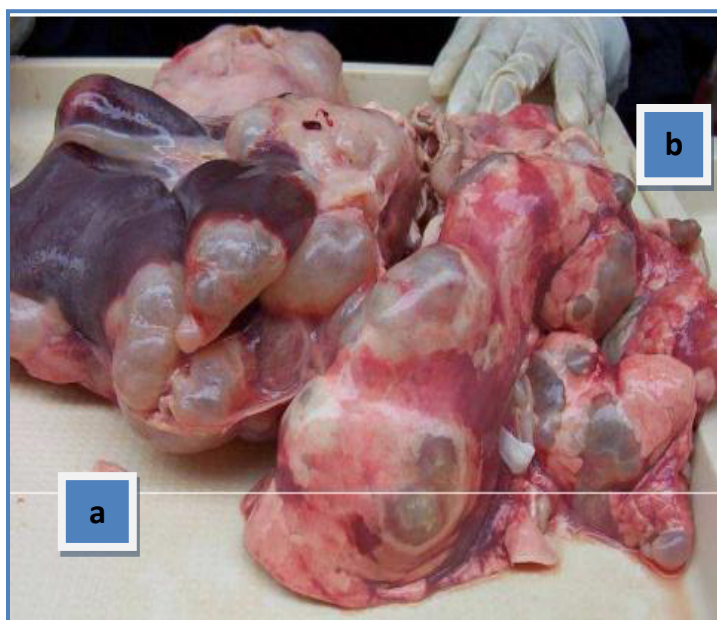


FIGURA 7. Quistes hidatídicos hepáticos (a) y pulmonares (b) de ovinos infectados naturalmente, de gran tamaño, sin calcificación y con membranas traslúcidas, típicas de quistes con protoescolices viables.

5.1.1. Separación de protoescolices del líquido hidatídico

Se realizaron 5 extracciones de protoescolices. Para ello se desinfectó la campana de flujo laminar, con luz ultravioleta (UV) por 15 minutos, donde se colocaron los quistes seleccionados, limpios y libres de sangre.

Con la ayuda de una aguja 16 x 1½" y una jeringa de 10ml, estériles, se recogió el contenido quístico por punción, teniendo cuidado de no extraer trozos de membrana. Dicho contenido quístico se depositó en tubos estériles de 50ml. Se seleccionaron los protoescolices provenientes de quistes con líquido transparente cuyo rango de viabilidad estuvo entre el 70-90% (Figura 8), ya que los líquidos que no son claros generalmente presentan baja viabilidad de protoescolices.



FIGURA 8. Líquidos hidatídicos obtenidos de quistes pulmonares y hepáticos. Se notan diferentes matices: a) Transparente, sin arenilla hidatídica; b) con color turbio, posiblemente por contaminación con bacterias, c) rojizo - parduzco por la presencia de sangre, y d) un líquido hidatídico de un color blanquecino por la presencia excesiva de protoescolices.

Se centrifugaron los tubos con el líquido hidatídico bruto a 2500 r.p.m por 5 minutos a temperatura ambiente (centrífuga Beckman Coulter) descartando el sobrenadante y conservando el sedimento (pellet) que contenían los protoescólices. Los lavados fueron 3 veces o más con solución fisiológica estéril (0.9%) conteniendo una mezcla de antibióticos (Bencilpenicilina sódica 1000000UI; gentamicina 80mg/2ml), hasta que la solución fuese clara al contacto con los protoescólex.

5.1.2. Tratamiento enzimático para la evaginación de los protoescólices

El procedimiento empleado se basó en el protocolo descrito por Molinari *et al.*, (1993) para oncósferas de *Tenia solium*. Los protoescólices lavados con suero fisiológico estéril fueron sometidos a un tratamiento enzimático al ser resuspendidos en 3-5 ml de AIF [(Fluido Intestinal Artificial), pH 8.04, bilis de cerdo 1%, bicarbonato de sodio 0.2%, Pancreatina 1%, enrasados con medio RPMI-1640 SIGMA] y se incubaron entre 1 hora a 1h ½ en agitación suave a temperatura ambiente. Luego se centrifugó la muestra a 1500 r.p.m. por 5 minutos, con el fin de eliminar el AIF y se observó al microscopio para visualizar los parásitos evaginados. Finalmente se lavó la muestra 2 veces con suero fisiológico estéril y con el medio de cultivo empleado.

5.1.3. Obtención de antígenos a partir de protoescólices de *E. granulosus*

5.1.3.1 Obtención de antígeno excretorio/secretorio (E/S): Mantenimiento *in vitro*

Los protoescólices se mantuvieron en frascos de cultivo estériles de 25 y 75 cm² de capacidad, dependiendo de la cantidad de protoescólices (Figura 9).

Se emplearon los siguientes medios de cultivo estériles:

- Medio MEM (Medio Mínimo Esencial Alpha, GIBCO) preparado con 1.5% de Bicarbonato de Sodio y se ajustó el pH a 7.4. Además se adicionó soluciones antibióticas (Bencilpenicilina sódica 1000000UI y gentamicina 80mg/2ml).
- Medio HAM F12 (Mezcla de Nutrientes HAM F12, SIGMA), que en su preparación se empleó 10.6% del medio HAM F12, y 1.5% de Bicarbonato de Sodio, se adicionó también soluciones antibióticas (Bencilpenicilina sódica 1000000UI y gentamicina 80mg/2ml).
- Medio HAM F12 (suplementado) cuya preparación es similar a la anterior, pero además se adicionó: glucosa (2%), glutamina (0.5%) y L-arginina (0.5%).

Los frascos de cultivo se mantuvieron en una incubadora a 37°C bajo una atmósfera de 95% de N₂ y 50% de CO₂. Se recolectó el antígeno E/S (sobrenadante) cada 24 horas mientras que los protoescólices evaginados presentaban viabilidad y movilidad. Los sobrenadantes fueron adecuadamente rotulados y conservados a -70°C hasta su utilización. En cada recolección se renovó el medio de cultivo utilizado.

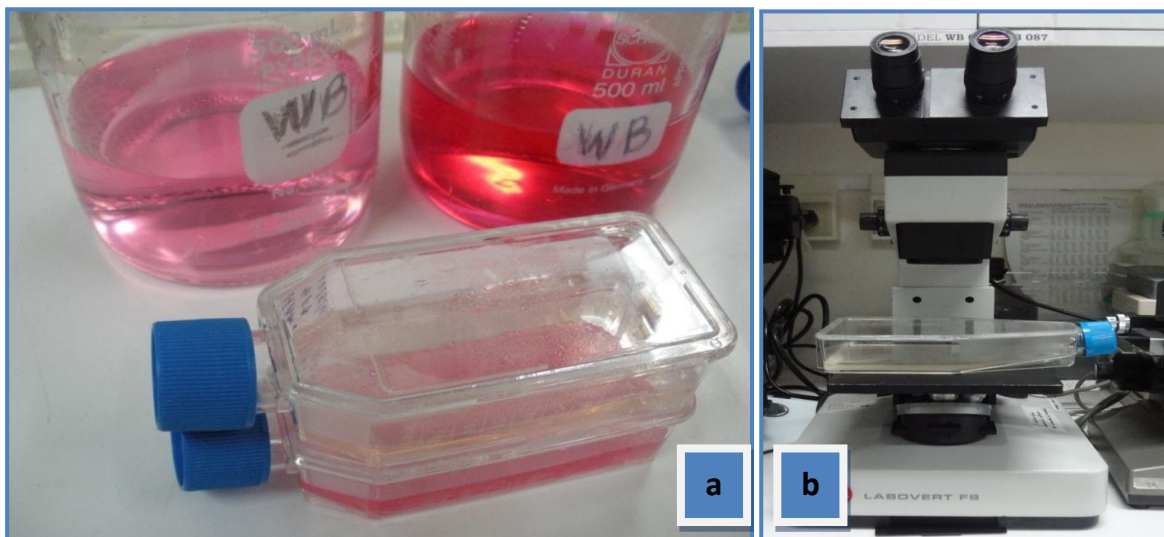


FIGURA 9. (a) Frascos de cultivo de 25 cm² conteniendo las muestras de PSC's y en la parte posterior las botellas con el medio HAM F12 y MEM (De izquierda a derecha). (b) Frascos de cultivo de 75 cm² empleados en la quinta extracción de PSC's.

5.1.3.2 Obtención de antígeno de proteínas de membrana (PM)

El aislamiento de proteínas de membrana se realizó con Tritón x-114 y deoxicolato de sodio al 10%.

- Aislamiento de proteínas de membrana con Tritón x-114

Se utilizó el protocolo de Santos *et al.*, (2006). Se empleó una fracción de protoescolices evaginados, previamente lavados con solución fisiológica (0.9%), los que fueron resuspendidos en 2 ml en buffer TBS frío [10mM de TRIS/140mM NaCl, pH 8.02 con 2% de Tritón x-114] durante 2 horas a 4°C. Luego se centrifugó a 10000g por 15 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante (extracto crudo) en un tubo siliconado de 1.5 ml.

El sobrenadante se incubó a 37°C por 5 minutos, se centrifugó a 10000g por 1 minuto, a temperatura ambiente, y se observaron dos fases: fase acuosa (proteínas hidrofílicas) y fase detergente (proteínas hidrofóbicas). Se recuperó la fase acuosa en otro tubo siliconado de 1.5ml, se agregó 100µl de buffer TBS frío y se incubó a 37°C por 5 minutos. Finalmente se volvió a centrifugar a 10000g durante 1 minuto, a temperatura ambiente, se descartó la fase detergente y se recuperó la fase acuosa la cual se conservó a -70°C hasta su uso.

- Aislamiento de proteínas de membrana con deoxicolato de sodio al 10%

Se utilizó el protocolo de Howard *et al.*, (1984). Los protoescolices evaginados fueron incubados en 500µl de buffer NET más 50µl de deoxicolato de sodio al 10% y se dejó incubar por 2 horas a 4°C; seguidamente se centrifugó a 10000g por 15 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante el cual fue colocado en una gradiente de sucrosa. Ésta fue preparada al fresco de la siguiente forma: 200µl de sucrosa al 60%, 200µl de sucrosa al 40%, 200µl de sucrosa al 20% y la muestra, respectivamente en ese orden en un tubo

siliconado de 1.5 ml, para ser centrifugado por 1 hora a 4000 r.p.m a 4°C. Luego se recuperó cada fase en tubos siliconados de 1.5 ml y se conservó a -70°C hasta su uso.

5.1.4. Adquisición de caninos para infección experimental

Todo el trabajo con perros se hizo según las normas internacionales para el uso adecuado de animales de experimentación y las regulaciones internas del Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Anexo1). Se obtuvieron 8 perros de razas cruzadas, destinados para eutanasia, de una edad aproximada de 3 meses, adquiridos por el Laboratorio de Medicina Veterinaria Preventiva (FMV-UNMSM). Los caninos fueron alojados en caniles y se les suministró alimento concentrado comercial y agua *ad libitum* hasta el día de su necropsia.

5.1.5. Acondicionamiento de los animales

Los perros fueron desparasitados tres veces en un lapso de 15 días con una combinación de Praziquantel (50 mg/kg), Febantel (150 mg/kg) y Emboato de Pirantel (50 mg/kg), para evitar la interferencia de otros parásitos en el desarrollo de *E. granulosus*. También se les aplicó Fipronil con la intención de eliminar los parásitos externos que presentan los cachorros al momento de su llegada. Después de un periodo de adaptación de unas 2 semanas, los caninos fueron vacunados contra Parvovirus y Distemper y se les aplicó una dosis de refuerzo después de 15 días contra Parvovirus, Distemper, Parainfluenza, Hepatitis y Leptospira.

5.1.6. Infección Experimental de caninos

Se utilizaron los protoescólices obtenidos de las vísceras con quistes hidatídicos. La evaluación de los protoescólices consistió en medir la viabilidad (tomando como

referencia una viabilidad $\geq 70\%$) y el conteo aproximado de los mismos, para poder estimar la dosis infectiva, que fue suministrada vía oral con una jeringa descartable a cada uno de los perros (Figura 10).

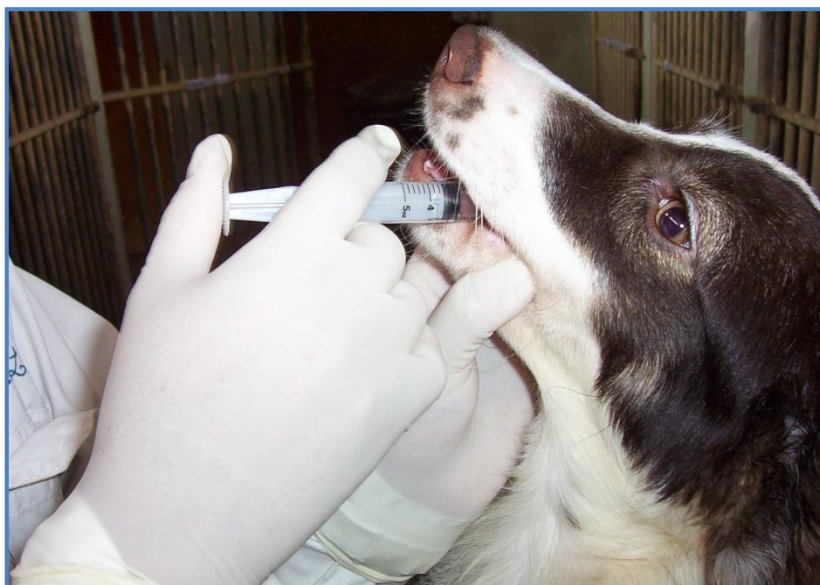


FIGURA 10. Infección experimental de un canino con protoescolices de quistes hidatídicos, por vía oral.

5.1.7. Eutanasia de los perros

Luego de 6-7 semanas post-inoculación, se procedió a la eutanasia de los animales y la necropsia de los mismos. Se les dejó en ayunas de 12-18 horas y se les anestesió con xylacina (0.2 mg/kg) y ketamina (10 mg/kg). Se realizó una laparotomía medial, se ligaron los extremos del intestino delgado y ésta se extrajo de la cavidad abdominal. Luego, se sacrificaron los animales con una inyección letal de embutramida, mebezonio y tetracaína (3 mg/kg).

5.1.8. Extracción de tenias adultas de *E. granulosus*

El intestino delgado se dividió en tres porciones iguales (anterior, medio y posterior) y se realizó una incisión longitudinal en cada sección. Cada una de estas porciones se fijó en láminas de tecnopor y se sumergió en bandejas con suero fisiológico 0.9% conteniendo antibióticos (Penicilina sódica 1000000UI y gentamicina 80mg). Se colocaron en un agitador por 20-30 min y se procedió a raspar la mucosa intestinal suavemente. Luego en placas Petri, con la ayuda de lupas, se separaron los gusanos de la mucosa intestinal, usando pipetas Pasteur estériles.

De una pequeña muestra se contó directamente el número de parásitos y por estimación volumétrica se estimó el número total. Todo este procedimiento se llevó a cabo en una campana de flujo laminar para evitar cualquier contaminación de las personas y los gusanos.

5.1.9. Obtención de antígeno partir de tenia adulta de *E. granulosus*

5.1.9.1 Obtención de antígeno excretorio/secretorio (E/S)

Para el aislamiento de antígeno (E/S) de tenias adultas, se empleó la misma metodología que se usó para el aislamiento de antígeno (E/S) de protoescólex evaginados. (Sección 5.1.4.1).

5.1.9.2 Obtención de antígeno de proteínas de membrana (PM)

Para el aislamiento de estas proteínas se empleó también Tritón x-114, bajo la misma metodología que se usó para el aislamiento de proteínas de membrana de protoescólex evaginados (Sección 5.1.4.2).

5.1.9.3 Obtención de antígeno total

Se descongelaron los parásitos almacenados a -70°C (utilizando hielo), provenientes de la necropsia de los perros y se usó un sonicador. Se escogió la punta adecuada dependiendo del volumen de la muestra y se colocó el tubo con la muestra en un recipiente con hielo (Figura 11), realizando el procedimiento en frío. Se programó a 60 Hz, 3 ciclos de 21 segundos. Finalmente se centrifugó por 30 minutos a 30000g a 4°C y se traspasó el sobrenadante a otro tubo.

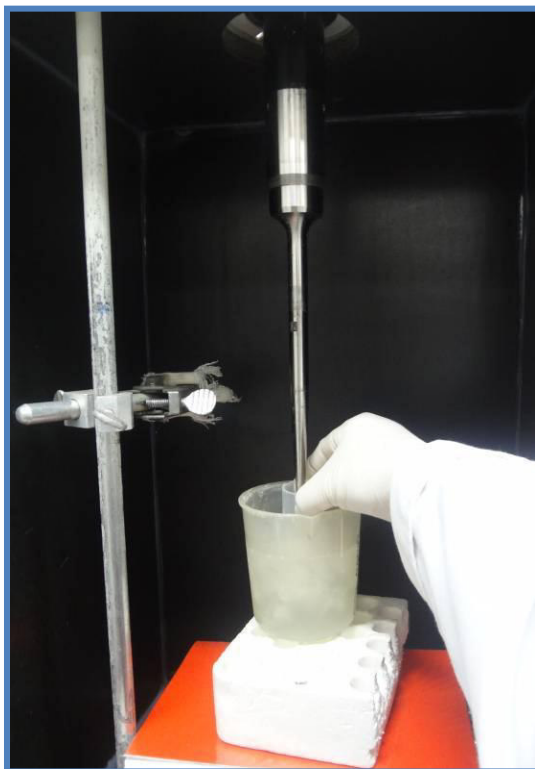


FIGURA 11. Colocación de la muestra de tenia adulta dentro de una cubeta de hielo para la sonicación, empleando la punta mediana.

5.1.10. Concentración, cuantificación y caracterización de antígenos de *E. granulosus*

5.1.10.1 Concentración de los antígenos E/S y Proteína Total

Se efectuó para lograr una mayor cuantificación de proteínas y tener los antígenos en un menor volumen, para ser inoculados por vía intranasal. Para ello se empleó la concentración por sistema Amicon conectado a una bomba de nitrógeno. Se utilizaron membranas en forma de disco de PLBC de 3 kDa NMWL y 25 mm de la marca MILLIPORE. Los accesorios del Amicon y la membrana fueron desinfectados y ensamblados con cuidado para evitar contaminación. Posteriormente se cargó el antígeno hasta un volumen de 50 ml y se concentró hasta un volumen final de 5ml.

5.1.10.2 Cuantificación de proteínas los antígenos: E/S, PM y Proteína Total

Para conocer la cantidad de proteína que poseen los antígenos, se empleó el método de Bradford. Para la curva estándar se usó un stock 10mg/ml de BSA, el cual se diluyó en una proporción 1 en 10, de dónde se preparó 8 puntos estándar a diferentes concentraciones: 0, 5, 10, 20, 40, 80, 100 y 200 (ug/ml). Se adicionó 20ul de los puntos estándar y muestras a cuantificar en cada pozo de la placa de ELISA. Posteriormente se agregó 200ul del reactivo Bradford, diluido 1 en 5, se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 minutos y se cuantificó en la lectora de ELISA utilizando el software SoftMAX Pro.

5.1.11.3 Caracterización de antígenos concentrados

Se empleó geles de poliacrilamida al 15% para evaluar la composición proteica que presenta cada antígeno. Se tomó como base el Manual de procedimientos de electroforesis del Instituto Nacional de Salud (INS, 2003).

- Ensamblaje de la cámara de electroforesis.- Se limpiaron las placas de vidrio, espaciadores, peines, soporte y tanque de electroforesis con alcohol para luego ser ensamblados.
- Preparación del gel de Resolución (15%).- Para ello se empleó Agua MilliQ, 30% mix de Acrilamida, 1.5 M Tris (pH 8.8), 10% SDS, 10% (APS) y TEMED. Luego de agregar la solución de poliacrilamida, se alineó el gel de Resolución al añadir una capa de isobutanol para evitar el ingreso de moléculas de oxígeno, que retardan la polimerización, y se dejó polimerizar aproximadamente por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Preparación de gel de Empacamiento (5%).- Se empleó Agua MilliQ, 30% mix de Acrilamida, 1.0M Tris (pH 6.8), 10% SDS, 10% (APS) y TEMED. Se descartó la capa de isobutanol y se lavó la parte superior del gel de Resolución con alcohol de 70° y agua Milli-Q exhaustivamente. Se agregó la solución del gel de Empacamiento evitando la formación de burbujas. Inmediatamente se colocó los peines y se dejó polimerizar por 30 minutos para poder guardar los geles en bolsas con agua MilliQ a -2 a -8°C. Después de 24 horas los geles preparados estaban listos para realizar la corrida.
- Preparación de la muestra biológica.- Se añadió 20ul del buffer de muestra para 1ml de antígeno. Se calentó agua a 65°C y se colocó el antígeno durante 15 minutos. Pasado el tiempo se armó la cámara de electroforesis para realizar la corrida.
- Corrida electroforética.- Después de 24 horas, se colocó los geles en la cámara de electroforesis. Se llenó con buffer fresco de TRIS-GLYCINA (1X), el espacio comprendido entre los dos geles. Se sumergió con cuidado la cámara en el tanque de electroforesis que contiene el buffer TRIS-GLYCINA (1x) usado, se añadió 20ul del antígeno y 5ul del marcador preteñido: Precision Plus Protein All Blue Estándar (BIORAD). Se conectó el tanque de electroforesis a la fuente de poder PowerPac (BIORAD), se utilizó 5mA por gel

y se dejó correr por 45 minutos hasta la alineación del frente de corrida. Luego se cambió las condiciones de la misma utilizando 25 mA por gel por 45 minutos.

- Coloración y visualización de las proteínas usando nitrato de plata.- Se empleó el kit comercial Silver Stain Plus (BIORAD) y se siguió las instrucciones del fabricante.

- Secado manual de geles de poliacrilamida.- Se remojó dos láminas de celofán de 15 x 15 cm en agua y una de ellas fue colocada encima de una placa de vidrio del tamaño del gel. Seguidamente, se colocó el gel sobre el celofán, se cubrió con la segunda lámina de celofán, se presionó el sistema tipo sándwich con grapas en todos los lados y se dejó secar por 1 día.

- Interpretación de resultados.- Se calculó el peso molecular de los antígenos empleados, a través de la ecuación de la recta del logaritmo del peso molecular (Log P.Mol.) de las bandas conocidas del marcador molecular y el Rf del mismo. La ecuación de la movilidad relativa (Rf) empleada fue:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la banda}}{\text{Distancia total del frente de corrida}}$$

5.2 Inmunización de perros con antígenos de *E. granulosus*

5.2.1. Preparación de Inóculos empleando adyuvante Quil A

La saponina Quil A tiene un efecto adverso cuando se une al colesterol de la membrana de los eritrocitos, ya que los rompe provocando anemia (Aguilar, 2000). Es por ello que se realizó una prueba piloto inoculando por vía intranasal 1ml de medio HAM F12 con adyuvante Quil A a una concentración de 50ug/ml, 100 ug/ml y 200 ug/ml en intervalos de una semana, tiempo en el cual se monitorio el comportamiento del animal (resultados no mostrados). Para esta prueba se tomó como base los reportes realizados por

García *et al.*, (2007) e Igarashi *et al.*, (2010). La finalidad de esta prueba fue no causar daños secundarios a los animales durante las inmunizaciones y optar por una concentración adecuada de adyuvante para inmunizar, empleando 50ug/ml de Quil A. Para la preparación de los inóculos se empleó un stock Quil A de 1mg/ml y se emplearon los antígenos de mayor concentración proteica y volumen.

5.2.2. Inmunización de perros por vía intranasal

Se utilizó 12 perros de razas cruzadas, de una edad aproximada de 3 meses y se procuró que provengan de una misma camada para evitar variabilidad genética y de respuesta. Los animales fueron obtenidos de la misma forma que se adquirieron los caninos para infección experimental (Sección 5.1.5)

Se emplearon 4 grupos de tratamientos de 3 animales cada uno: (1) placebo o grupo control (Quil A + medio HAM F12), (2) antígeno metabólico (E/S) de protoescolices y tenia adulta + Quil A + HAM F12, (3) antígeno de superficie (PM) de protoescolices y tenia adulta + Quil A + HAM F12 y (4) antígeno o proteína total de tenia adulta + Quil A+ HAM F12. La concentración de cada antígeno anteriormente mencionado fue de 200ug por dosis de vacunación.

Por motivos de bioseguridad e infraestructura se trabajó en 3 diferentes tiempos, con 4 animales, es decir 1 animal/grupo de tratamiento, por cuestiones de espacio, fácil manipulación y obtención de suficientes muestras de protoescolices para enfrentamiento.

Los animales recibieron tres inmunizaciones en intervalos de 15 días, entre cada una, por vía intranasal. El volumen empleado de antígeno se distribuyó de forma equitativa en ambas fosas nasales del animal (Figura 13) y para asegurar que todo el volumen fuera inoculado, se anestesió de forma parcial a los perros, empleando ketamina (10mg/ml) por

vía intravenosa, con la finalidad de provocar letargo en los animales y una fácil manipulación en la inmunización (Figura 12).



FIGURA 12. Aplicación de ketamina por vía intravenosa en el perro EG067.



FIGURA 13. Inmunización del perro EG073 por vía intranasal, empleando una jeringa tuberculina cargada con el antígeno E/S (PSC's + tenia adulta).

5.3 Infección experimental de perros inmunizados

5.3.1. Cantidad y viabilidad de protoescolices

Los perros fueron enfrentados por vía oral a las dos semanas de la última inmunización, con protoescolices viables de quistes de hígado y pulmón, provenientes de ovejas de Pachacayo (Huancayo). Se evaluó la viabilidad de los protoescolices por tinción con eosina, empleando las muestras con una viabilidad $\geq 70\%$, con la finalidad de obtener un alto grado de supervivencia *in vivo* (Herd *et al.*, 1975).

5.3.2. Recuperación, conteo y medición de tenias adultas

La necropsia de los perros se efectuó entre los 42-53 días después del enfrentamiento, realizando dos necropsias de perros por día.

La recuperación de las tenias adultas fue llevada a cabo de la misma forma en que se aisló las tenias para la obtención de antígeno (Sección 5.1.9). Luego se realizó el recuento total de tenias por estimación volumétrica, es decir se realizó la contabilización de un volumen conocido y se extrapoló el número total a través del volumen de parásitos que se obtuvo.

Se realizó la medición de la longitud de las tenias, tomando como tamaño muestral a 25 tenias de cada perro tratado, para ello se empleó un ocular micrométrico con una regla de 10UO (unidades ópticas) en donde cada UO equivale a 0.025 cm.

Se determinó la presencia/ausencia de huevos, evaluando el sobrenadante de las muestras de las tenias adultas extraídas de cada perro por microscopía de luz óptica y, para determinar la madurez de los mismos se tomó como referencia la presencia de la membrana externa altamente diferenciada, observada como una capa oscura en los huevos maduros y como una fina capa en los huevos inmaduros.

5.3.3. Procedimiento de Análisis e Interpretación

Para determinar las diferencias estadísticas entre el número de parásitos adultos de *E. granulosus*, que desarrollaron los perros del grupo control y del inmunizado con cada uno de los tratamientos (E/S, PM y Proteína total) se usó el *test* no paramétrico de Kruskal- Wallis, que también fue utilizado para evaluar la longitud de las tenias que presentó cada grupo de perros. Por último, la presencia de huevos fue analizado por el *test* de Fisher. Los datos fueron ingresados usando el programa Excel y analizados con el programa STATA versión 10.0 (nivel de significancia ≥ 0.05).

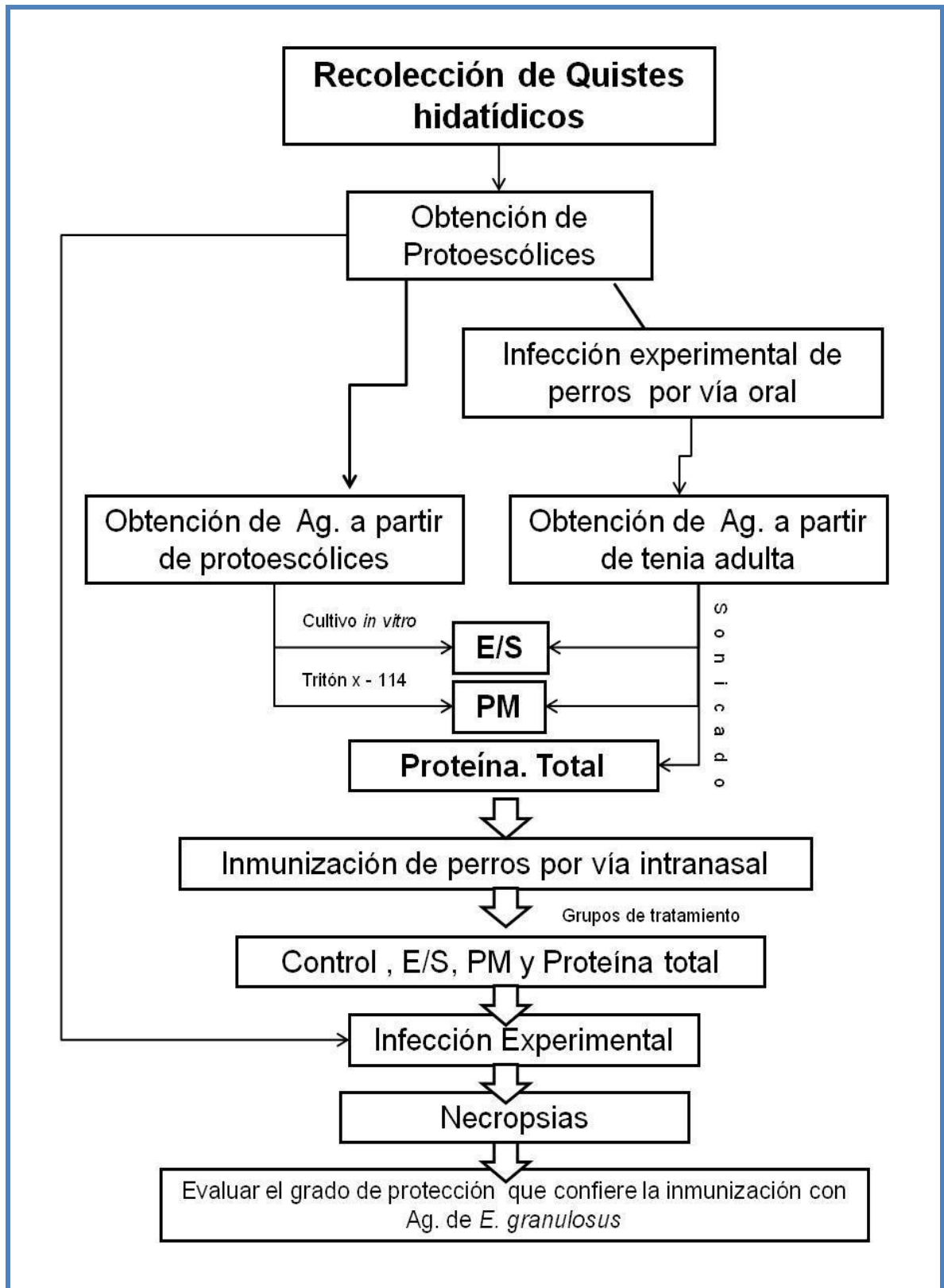


FIGURA 14. Flujograma de la metodología empleada.

VI. RESULTADOS

6.1 Obtención de antígenos de *E. granulosus*

6.1.1 Tratamiento enzimático para la evaginación de los protoescólices

Se realizaron un total de cinco extracciones de protoescólices. Para las muestras de la primera extracción no se realizó el tratamiento enzimático con AIF (Fluido intestinal artificial) para la evaginación de los mismos y en consecuencia el 95 - 100% de los protoescólices se encontraban invaginados (Figura 15).

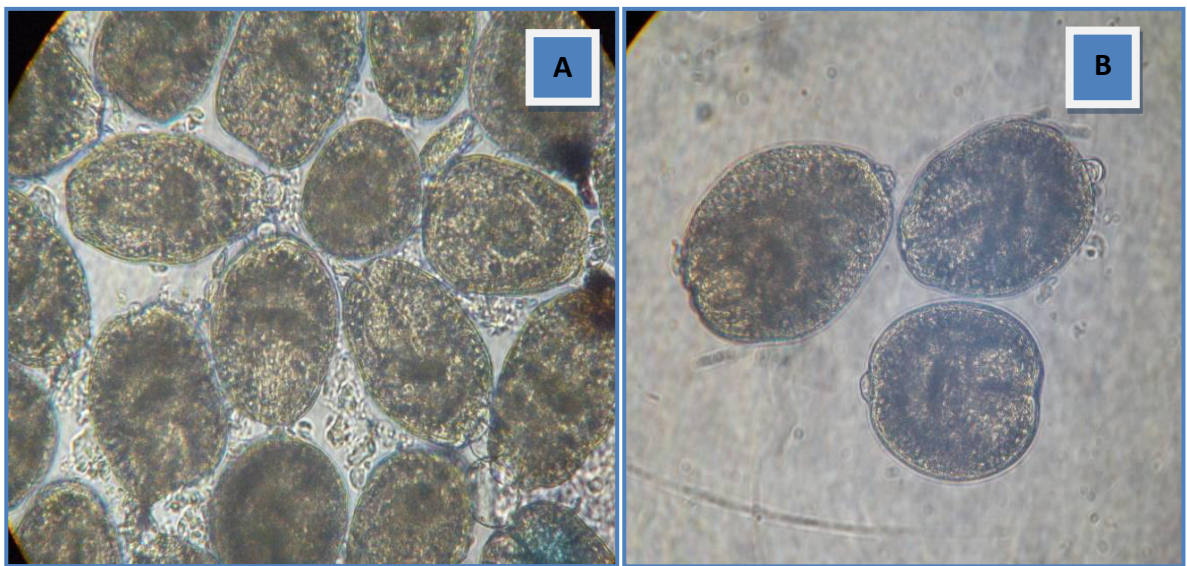


FIGURA 15. (A) y (B) Protoescólices invaginados de la primera extracción debido a que se omitió el tratamiento enzimático con (AIF).

En la segunda y tercera extracción se realizó el tratamiento enzimático de las muestras por 1 hora, y se logró obtener un 45% protoescólices evaginados (Figura 16 y 17), pero tal tratamiento no fue satisfactorio, porque aún se apreciaba una gran cantidad de protoescólices invaginados.

En las dos últimas extracciones, se realizó el tratamiento enzimático por 1h 30min, y se resuspendió la muestra en mayor volumen de AIF, y se logró un 85 - 95% de protoescolices evaginados, porcentaje que fue aumentando ya que el número de protoescolices invaginados restantes se fueron activando durante el cultivo *in vitro*.

6.1.2 Obtención de antígenos a partir de protoescolices de *E. granulosus*

6.1.2.1 Obtención de antígeno excretorio/secretorio (E/S): Mantenimiento *in vitro*

Para las muestras de la primera extracción se empleó el medio MEM y se logró una viabilidad de los parásitos por 7 días, ya que a medida que pasaban los días los parásitos perdían su morfología, sus ganchos y la movilidad.

Para las muestras de la segunda y tercera extracción, se emplearon los medios de cultivo MEM y HAM F12 y nos permitieron una viabilidad de los parásitos por 10 días, viéndose en cada frasco de cultivo que los parásitos perdían sus ganchos y que éstos aumentaban en el medio de forma gradual mientras transcurrían los días (Figura 17). Además se observó que la movilidad de los parásitos empezaba a disminuir a partir del día 5 de cultivo, hasta que el movimiento se hacía cada vez más imperceptible al llegar al día 10.

Se observó que el número de parásitos lisados empezaban a presentarse aproximadamente alrededor del día 6, aumentando de forma gradual hasta llegar al día 10, pudiendo confirmarse que en el día 10 no hubo protoescolices viables. En base a todas las características mencionadas, se observó que en base a la organización del tegumento y la forma que presentaban los protoescolices en el día 10, la efectividad de los medios de cultivo es casi similar, siendo el medio HAM F12 ligeramente mejor que el medio MEM.

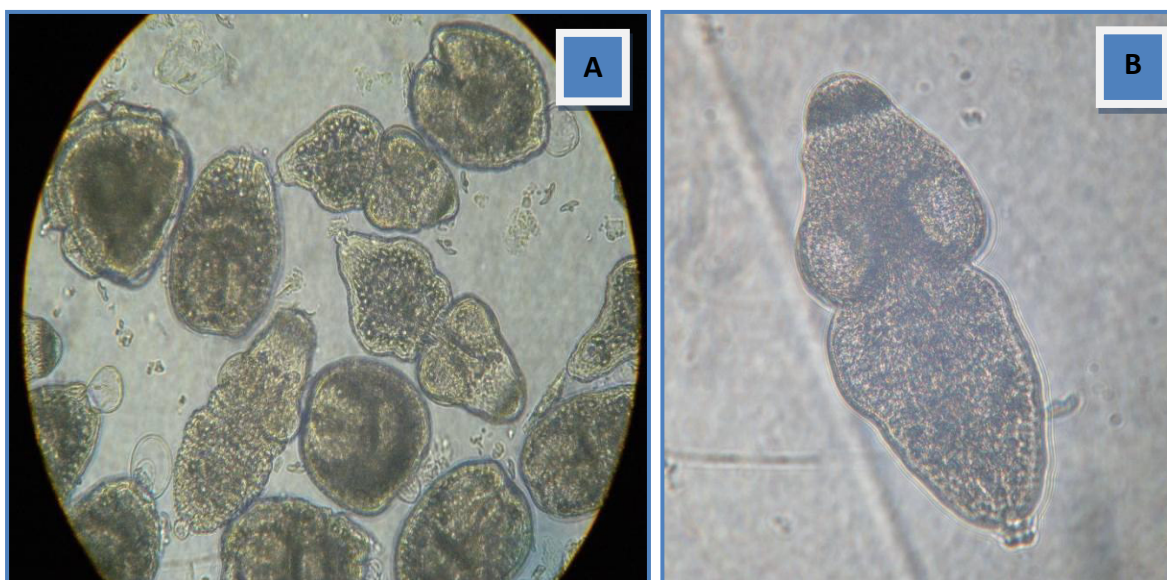
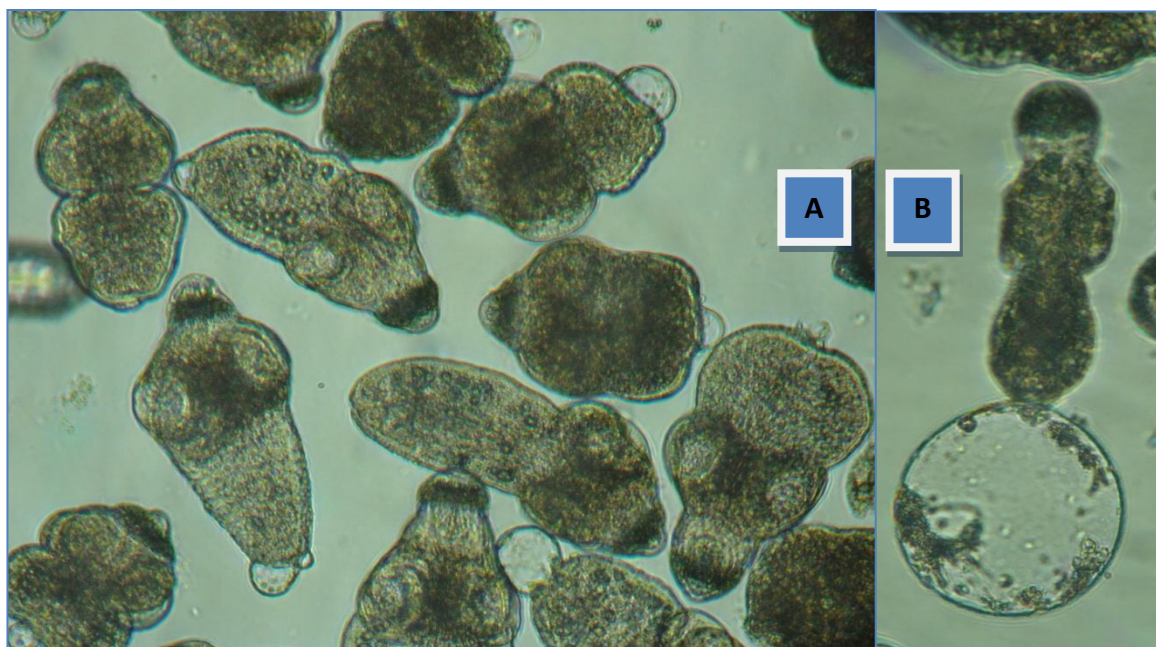


FIGURA 16. (A) Campo de protoescólices (PSC's) invaginados y evaginados de la segunda extracción en medio MEM. (B) protoescólex de la tercera extracción en medio HAM F12.



FIGURA 17. Protoescólices (PSC's) evaginados de la segunda extracción en medio MEM. Se aprecia la presencia de ganchos en el medio.

En la cuarta extracción no se obtuvo una gran cantidad de protoescólex y sólo se empleó el medio HAM F12 suplementado (Sección 5.1.4.1) para el cultivo *in vitro*. Los resultados fueron óptimos ya que se logró mantener a los parásitos por 14 días. En la quinta extracción se obtuvo una gran cantidad de protoescólices, mucho mayor que todas las extracciones anteriores, motivo por el cual se utilizó frascos de cultivo de 75cm² de área en lugar de los frascos de 25cm² de área, se empleó el medio HAM F12 suplementado y se logró mantener a los parásitos por



32 días (Figuras 9, 18 y 19).

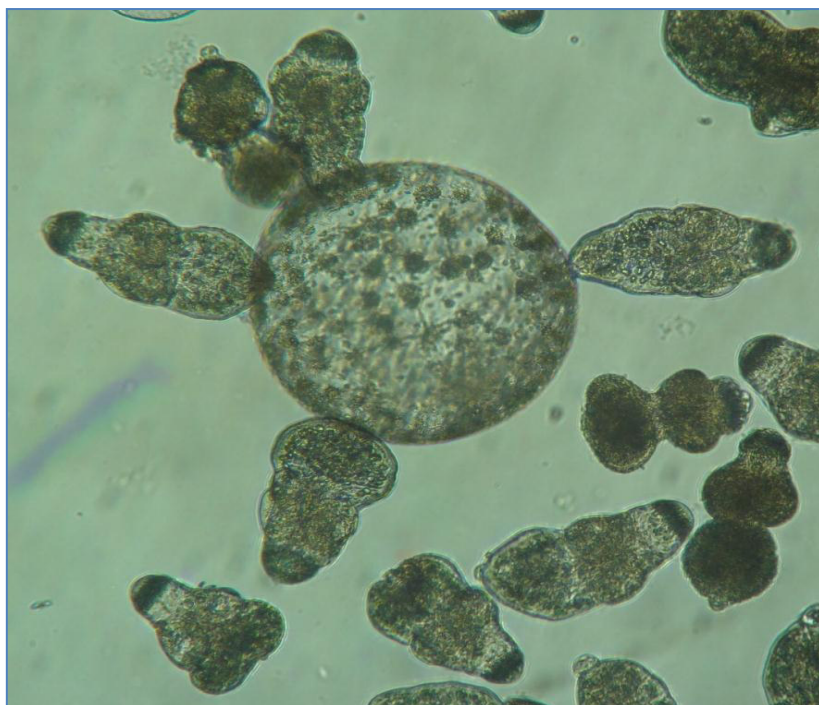


FIGURA 19. Vesícula con múltiples PSC's evaginados de la quinta extracción en medio HAM F12 suplementado.

Se realizó un *pool* de todo el antígeno E/S recolectado durante el cultivo *in vitro* de los protoesclóicos de la primera y segunda extracción, teniendo un volumen total de 50 ml, mientras que el *pool* del antígeno E/S de la tercera y cuarta extracción fueron de 55 y 65 ml, respectivamente. De la quinta extracción, debido a que se mantuvo a los parásitos durante un mayor periodo de tiempo (32 días), se obtuvo un mayor volumen de antígeno, por ello sólo se realizó el *pool* de los primeros 10 días de cultivo, adquiriendo un volumen total de 100 ml (Tabla 3). El volumen de antígeno de los otros 22 días de cultivo fue almacenado a -70°C para futuros estudios. Todos los *pools* obtenidos se concentraron por el sistema AMICON y se realizó la cuantificación de proteínas antes y después de concentrar, cuyos valores se presentan en la Tabla 3.

TABLA 3. Cuantificación de proteínas del antígeno E/S obtenido *in vitro* de PSC's

Muestras	Después de Concentrar (µg/ml)	Vol. final (ml)	Antes de Concentrar (µg/ml)	Vol. inicial (ml)
Primera y Segunda extracción	138.617	3	20.40	50
Tercera extracción	76.6	5	16.06	55
Cuarta extracción	174.6	15	16.74	65
Quinta extracción	216.3	8	18.99	100

E/S = Excretorio/ Secretorio
PSC's = Protoescólices

6.1.2.2 Obtención de antígeno de proteínas de membrana (PM)

Se aisló las proteínas de membrana de las muestras de la tercera extracción, con la metodología de deoxicolato de sodio al 10% y se obtuvo una concentración de proteínas de 333.4 µg/ml, mientras que con Tritón x-114 se obtuvo 421.7 µg/ml de concentración. La metodología con Tritón x-114 resultó ser rápida, fácil de utilizar y más eficiente al presentar componentes proteicos más definidos (Figura 22), motivos por los cuales se realizaron los subsiguientes procedimientos con Tritón x-114 y se obtuvo una concentración proteica de 419.1 y 405.4 µg/ml, en las muestras de la cuarta y quinta extracción, respectivamente.

Además, con Tritón x -114 sólo se consideró la fase acuosa, ya que al caracterizar la fase detergente y el extracto crudo no se obtuvo un patrón de bandas definidas (resultados no mostrados).

6.1.3 Infección Experimental de caninos y Extracción de tenias adultas de *E. granulosus*

Para la infección de los 7 perros, se empleó 115050 protoescólices viables en cuatro perros y 187200; 571500 y 217200 protoescólices en los tres últimos perros, respectivamente (Tabla 4). Todas las infecciones fueron exitosas, pues los 7 caninos presentaron tenias en el intestino delgado. El rango del número de tenias recuperadas fue de 1500 a 18184 tal como se aprecia en la Tabla 4.

TABLA 4. Características de los caninos infectados y cantidad de tenias adultas recuperadas

ID Animal	Edad (Meses)	Sexo	INÓCULO (Nº de PSC's viables)	Nº EG Recuperados
EG049	5	Hembra	115050	1500
EG050	5	Hembra	115050	1637
EG051	5	Hembra	115050	18188
EG052	5	Hembra	115050	6182
EG053	4	Macho	187200	1060
EG054	8	Hembra	571500	15091
EG064	5	Hembra	217200	1714

PSC's = Protoescólices

EG = *Echinococcus granulosus*

6.1.4 Obtención de antígeno partir de tenia adulta de *E. granulosus*

6.1.4.1 Obtención de antígeno excretorio/secretorio (E/S)

Las tenias adultas del primer perro (EG049) fueron utilizadas en su totalidad para la extracción de proteínas de membrana. Los parásitos adultos del segundo y tercer perro (EG050 y EG051) se utilizaron para cultivo *in vitro* (aproximadamente 50 tenias por frasco de cultivo). Se empleó para ello el medio MEM (Medio Esencial Mínimo), que permitió

mantener viables los parásitos por 6 días, tiempo en que se recolectó el sobrenadante de forma diaria. Durante los primeros tres días casi la totalidad de los parásitos presentaron alto porcentaje de viabilidad, ya que poseían movimiento peristáltico y el tegumento íntegro. Pero con el transcurso del tiempo, se incrementaba el número de parásitos que presentaban pérdida del tegumento, abultamiento en su estructura morfológica y pérdida de movilidad, siendo más notorio a partir del 4to día.

Para las tenias del cuarto (EG052) y quinto perro (EG053) se empleó además del medio MEM, el medio HAM F12, lográndose una viabilidad de 5 días para las tenias de EG052 por cada medio (Figura 21). No obstante, al tomar como referencia la integridad del tegumento que presentaban los parásitos y la presencia/ausencia de abultamientos a lo largo de la estructura en el 5to día, se pudo observar que el medio HAM F12 fue mucho más efectivo al lograr una mayor conservación del tegumento y de la estructura (Figura 21). De la misma manera resultó para las tenias de EG053, en donde el medio HAM F12 logró una mayor conservación de las mismas, permitiendo una viabilidad de los parásitos de 6 días (Figura 20).

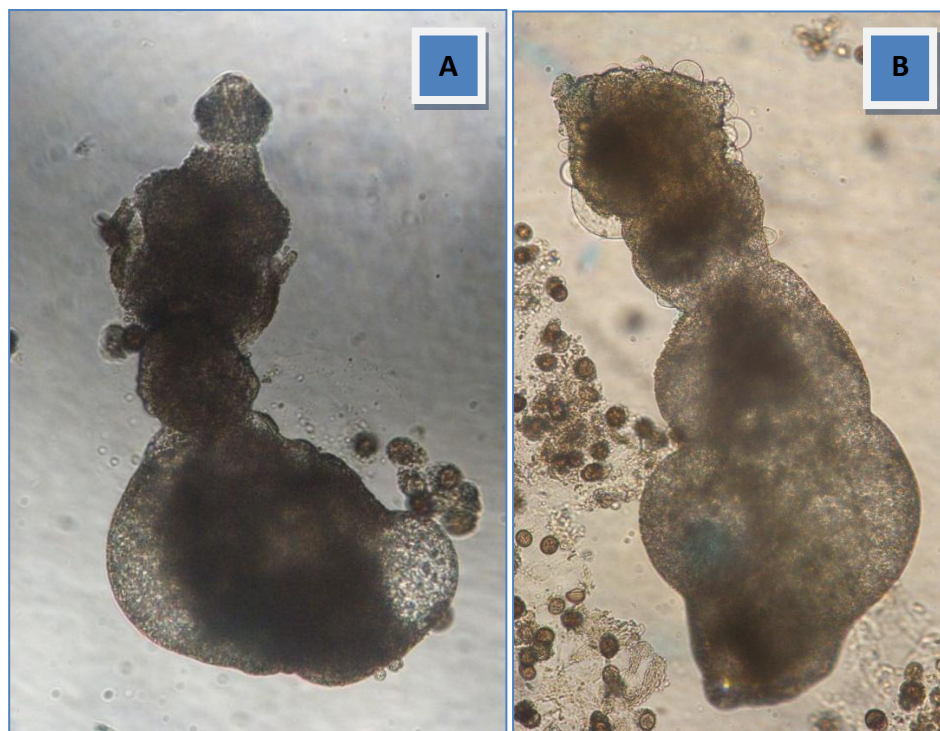
Para los dos últimos perros (EG054 y EG064) sólo se empleó el medio HAM F12 suplementado (Sección 5.1.4.1). Se observó mejores resultados en cuanto a la conservación de la integridad morfológica de las tenias, presencia del tegumento como su viabilidad, puesto que permitió una viabilidad de 15 días.



FIGURA 20. Tenias de *E. granulosus* del quinto perro (EG053) al tercer día de cultivo.

(A) Tenia en medio de cultivo HAM F12 y (B) Tenia en medio de cultivo MEM.

Se
realizó
pool de
el



un
todo

FIGURA 21. Tenias de *E. granulosus* del cuarto perro (EG052) en proceso de degeneración después del quinto día de cultivo. (A) Tenia en medio HAM F12 y (B)

Tenia en medio MEM.

2

de los parásitos adultos de EG050, EG051, EG052, EG53, EG054 y EG064, a excepción de EG049, teniendo un volumen total de 40, 50, 31, 40, 65 y 80 ml, respectivamente (Tabla 5). Todos los *pools* obtenidos se concentraron por sistema AMICON y se realizó la cuantificación de proteínas antes y después de concentrar, cuyos valores se muestra en la Tabla 5.

TABLA 5. Cuantificación de proteínas del antígeno E/S obtenido *in vitro* de tenias adultas

Muestras	Después de Concentrar ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. final (ml)	Antes de Concentrar ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. inicial (ml)
Segundo perro EG050	139.69	2	36.961	40
Tercer perro EG051	138.62	1	28.49	50
Cuarto perro EG052	164.72	2	14.23	31
Quinto perro EG053	160.6	2	24.48	40
Sexto perro EG054	318.18	2	35.55	65
Séptimo perro EG064	274.72	8	27.92	80

6.1.4.2 Obtención de antígeno de proteínas de membrana (PM)

Una fracción de las tenias obtenidas del segundo perro- EG050 (1400 gusanos), tercer perro - EG051 (4546 gusanos), cuarto perro- EG052 (1288 gusanos), quinto perro- EG053 (1500 gusanos) y sexto perro- EG054 (1020 gusanos), a excepción del primer perro en donde se utilizó el total obtenido (1637 gusanos), ha sido empleada para el aislamiento de proteínas de membrana con Tritón x -114. Se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, de la fase detergente (proteínas hidrofóbicas), fase acuosa (proteínas hidrofílicas) y extracto crudo, de cada perro, como se observa en la Tabla 6. Pero sólo se consideró la cuantificación de proteínas de la fase acuosa.

TABLA 6. Cuantificación de proteínas del antígeno de PM de tenia adulta

Muestras/ Fase Acuosa	Volumen ml	Concentración de proteína ($\mu\text{g/ml}$)
EG049	0.5	391.7
EG050	1	362.0
EG051	1	483.1
EG052	1	461.6
EG053	2	372.1
EG054	11	390.6

6.1.4.3 Obtención de antígeno total

Se realizó la concentración del antígeno total del tercer (EG051) y cuarto perro (EG052) y, se obtuvo 293.55 y 190.31 $\mu\text{g/ml}$ de concentración proteica, respectivamente, como se muestra en la Tabla 7.

El antígeno total del sexto perro (EG054) no se concentró, ya que se obtuvo una mayor concentración de proteínas 305.651 $\mu\text{g/ml}$ en un volumen de 11 ml, a comparación del tercer y cuarto perro.

TABLA 7. Cuantificación de proteínas del antígeno total de EG051 y EG052

Muestras	Después de Concentrar ($\mu\text{g/ml}$)	Vol.final (ml)	Antes de Concentrar ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. inicial (ml)
Sonicado EG051	293.55	1	214.8	7
Sonicado EG052	190.31	1	169.2	15
Sonicado EG054	305.65	11	----	----

6.1.4.4 Caracterización de antígenos concentrados

En el gel No.1 (Figura 22) se comparó el patrón de bandas de las proteínas de membrana de protoescólex, extraídas con la metodología de deoxicolato de sodio y Tritón x-114, empleando únicamente la fase acuosa, ya que la fase detergente no presentaba un patrón de bandas definido (resultados no mostrados).

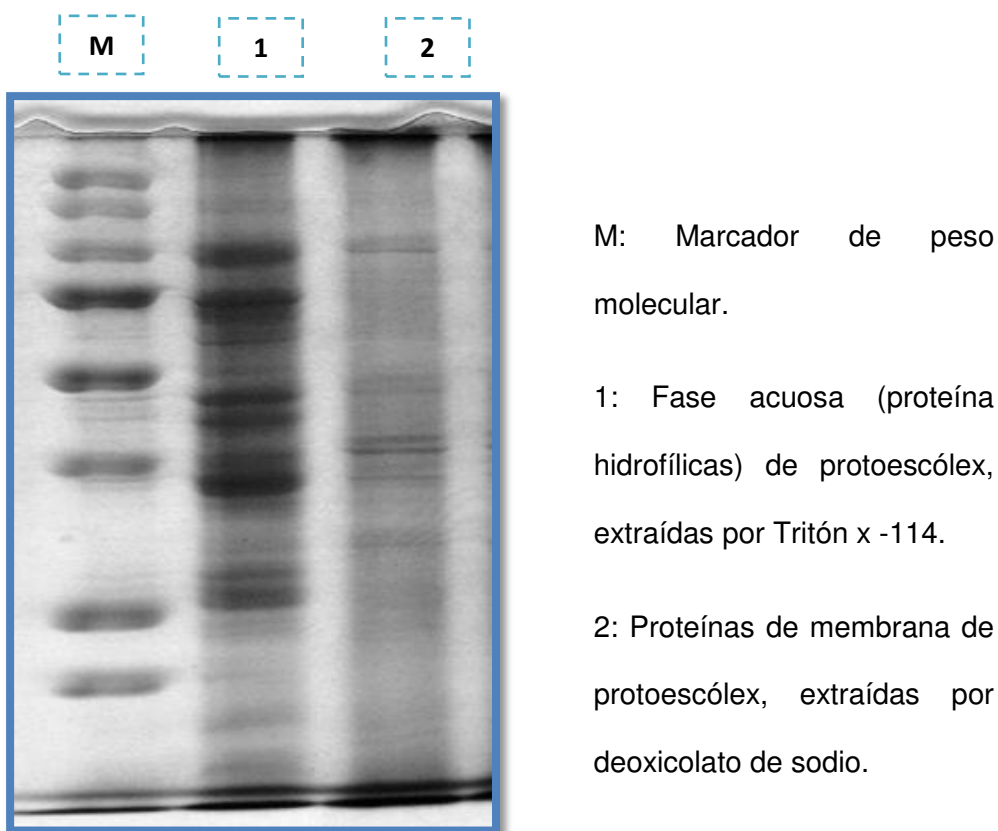


FIGURA 22. Gel No.1 patrón de bandas de las PM de protoescólex por deoxicolato de sodio y Tritón x-114.

La longitud total del gel No.1 fue de 6.2cm, medida que se usó para hallar los valores de Rf de las bandas proteicas del marcador molecular, como se observa en la Tabla 8.

TABLA 8. Valores de Rf de bandas proteicas del marcador molecular del gel No.1

Peso Molecular (KDa)	Rf	Log (P.Mol.)
250	0.065	2.4
150	0.097	2.2
100	0.161	2.0
75	0.242	1.9
50	0.290	1.7
37	0.355	1.6
25	0.484	1.4
20	0.516	1.3
15	0.726	1.2
10	0.806	1.0

P. Mol. = Peso molecular

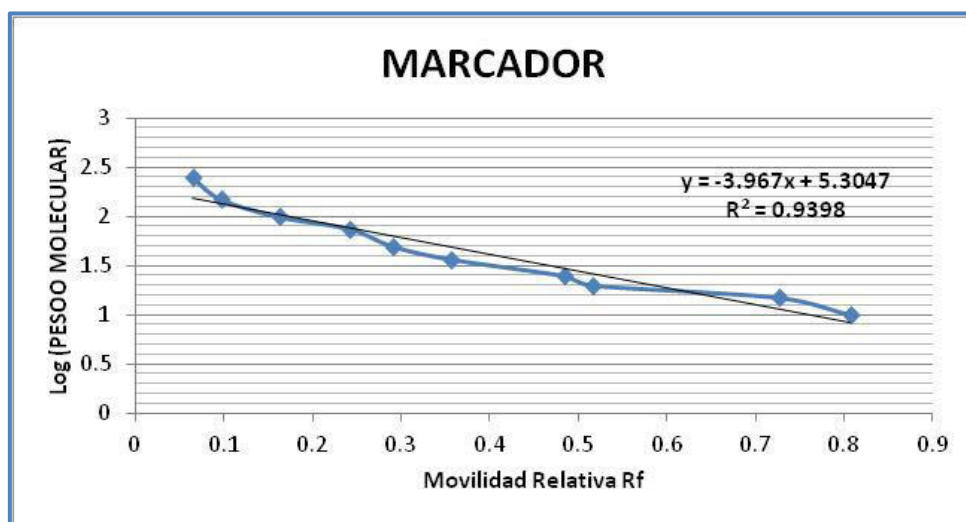
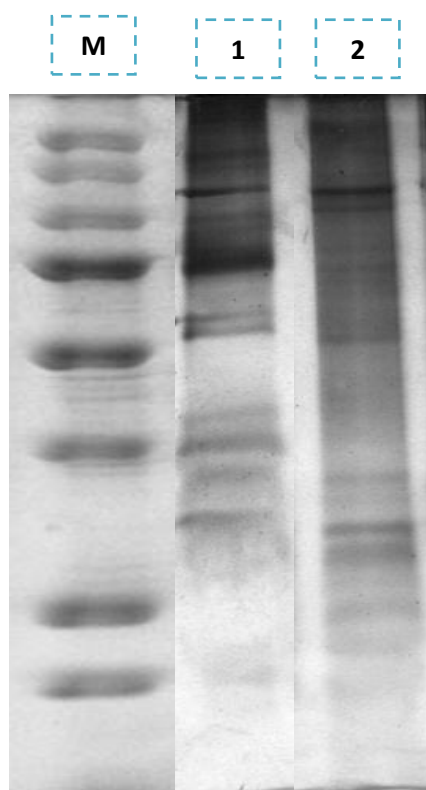


FIGURA 23. Ecuación de la recta obtenida a partir del marcador molecular del gel No.1.

Tomando la ecuación de la recta, que se muestra en la Figura 23, se halló el peso molecular de las bandas desconocidas del carril 1 y 2 del Gel No.1, cuyos valores se muestran en el Anexos 2.

En el Gel No.2 (Figura 24) se muestra el patrón electroforético del antígeno E/S de protoescólex (carril 1) y tenia adulta (carril 2). En el carril 1 se muestran 12 bandas proteicas, cuyos pesos moleculares se encuentran en un rango de 155.83 y 18.86 KDa, como se observa en el Anexo 3, mientras que en el carril 2 se muestran 11 bandas proteicas, cuyos pesos moleculares se encuentran entre 177.10 y 7.22 KDa.



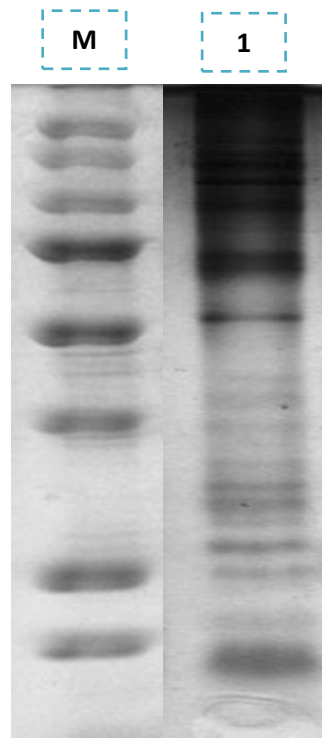
M: Marcador de peso molecular.

1: E/S de protoescólex.

2: E/S de tenia adulta.

FIGURA 24. Gel No.2 patrón electroforético de E/S de protoescólex y tenia adulta.

En el Gel No.3 (Figura 25) se muestra el patrón electroforético del antígeno de PM de tenia adulta y se observó 18 bandas proteicas, cuyos pesos moleculares se encuentran en un rango de 155.83 y 6.36 KDa, como se observa en el Anexo 4.

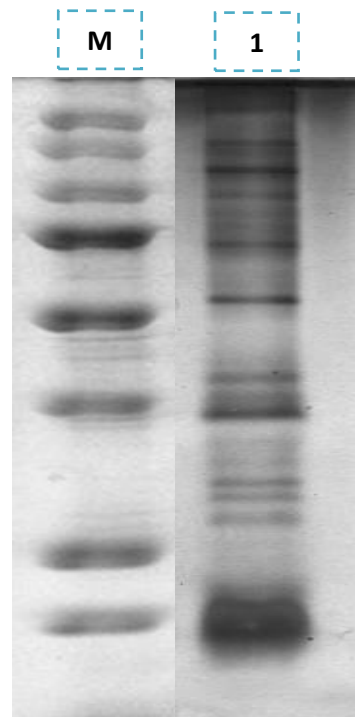


M: Marcador de peso molecular.

1: Proteína de membrana (PM) de tenia adulta, extraídas con Tritón x-114

FIGURA 25. Gel No.3 patrón electroforético de las PM de tenia adulta.

En el Gel No.4 (Figura 26) se muestra el patrón electroforético del antígeno total de tenia adulta y se observó 14 bandas proteicas, cuyos pesos moleculares se encuentran en un rango de 166.13 y 7.70 KDa, como se observa en el Anexo 5.



M: Marcador de peso molecular.

1: Antígeno total de tenia adulta.

FIGURA 26. Gel No.4 patrón electroforético del antígeno total de tenia adulta.

6.2 Inmunización de perros con antígenos de *E. granulosus*

6.2.1 Preparación de Inóculos empleando adyuvante Quil A

Para la preparación del inóculo con el antígeno (E/S), se utilizó en el caso de las tenias adultas, el antígeno obtenido del sexto perro- EG054 (318.18 $\mu\text{g/ml}$) y séptimo perro- EG064 (274.72 $\mu\text{g/ml}$) (Tabla 5), mientras que en el caso de protoescólex se empleó el antígeno obtenido en la cuarta (174.6 $\mu\text{g/ml}$) y quinta extracción (216.3 $\mu\text{g/ml}$) (Tabla 3).

Para la preparación del inóculo con el antígeno de PM se empleó la fase acuosa del perro EG054 (390.6 $\mu\text{g/ml}$) (Tabla 6) de tenias adultas y para protoescólex se usó el antígeno obtenido de la muestra de la quinta extracción (405.4 $\mu\text{g/ml}$) (Sección 6.1.2.2).

Finalmente para la preparación del inóculo con el antígeno total de tenia adulta se empleó el antígeno del sexto perro-EG054 (305.651 $\mu\text{g/ml}$) (Sección 6.1.4.3).

Los cálculos empleados (Regla de tres simple) para conocer el volumen a utilizar de cada antígeno, se muestran en el Anexo 6.

6.3 Infección experimental de perros inmunizados

6.3.1 Cantidad y viabilidad de protoescólices

En el primer tiempo, los 4 primeros perros (1 perro/ grupo de tratamiento) fueron infectados con 150000 protoescólices, mientras que en el segundo y tercer tiempo, los otros 8 perros, fueron infectados con 100000 protoescólices (Tabla 9).

Al evaluar la viabilidad de los protoescólices por tinción eosina, se obtuvo una viabilidad promedio de 87, 70 y 69.2%, valores promedios obtenidos a partir de la viabilidad de protoescólices de hígado y pulmón, como se observa en la Tabla 9.

TABLA 9. Viabilidad promedio de protoescólices para enfrentamiento de perros

ID	N° PSC's para enfrentamiento	Viabilidad de protoescólices		Viabilidad promedio
		Hígado	Pulmón	
Primer Tiempo	150000	88%	86%	87%
Segundo Tiempo	100000	65.6%	74.4%	70%
Tercer Tiempo	100000	60.4%	77.9%	69.2%

PSC's = Protoescólices

6.3.2 Recuperación, conteo y medición de tenias adultas

Al evaluar la carga parasitaria de los perros inmunizados con antígeno E/S se obtuvo entre 1100 a 19250 tenias adultas, los inmunizados con antígeno de PM presentaron entre 2619 a 36750 parásitos, mientras que los perros inmunizados con antígeno total obtuvieron entre 3460 a 37000 y los perros control presentaron entre 4400 a 43000 de parásitos, como se muestra en la Tabla 10.

Al realizar la medición de la longitud de las tenias adultas, se encontró que el perro EG060 tratado con antígeno de PM (Figura 27) presentó la mayor longitud promedio de tenias, en comparación a los demás animales, como se muestra en la Tabla 10, en donde se muestra también que la tenias de los perros EG067 y EG070, no fueron evaluados por pérdida de muestra.



FIGURA 27. Medición con ocular micrométrico del largo de las tenias obtenidos del perro EG060 tratado con PM.



FIGURA 28. Presencia de huevos maduros provenientes del proglótido grávido de las tenias del perro control EG059.

Al determinar la presencia/ausencia de huevos en los sobrenadantes de las muestras de las tenias de los perros, se obtuvo que los perros control presentaron huevos maduros (Figura 28 y 29a) y los perros inmunizados con proteína total presentaron huevos inmaduros (Figura 29b), mientras que los perros inmunizados con E/S y PM no presentaron huevos (Tabla 10).

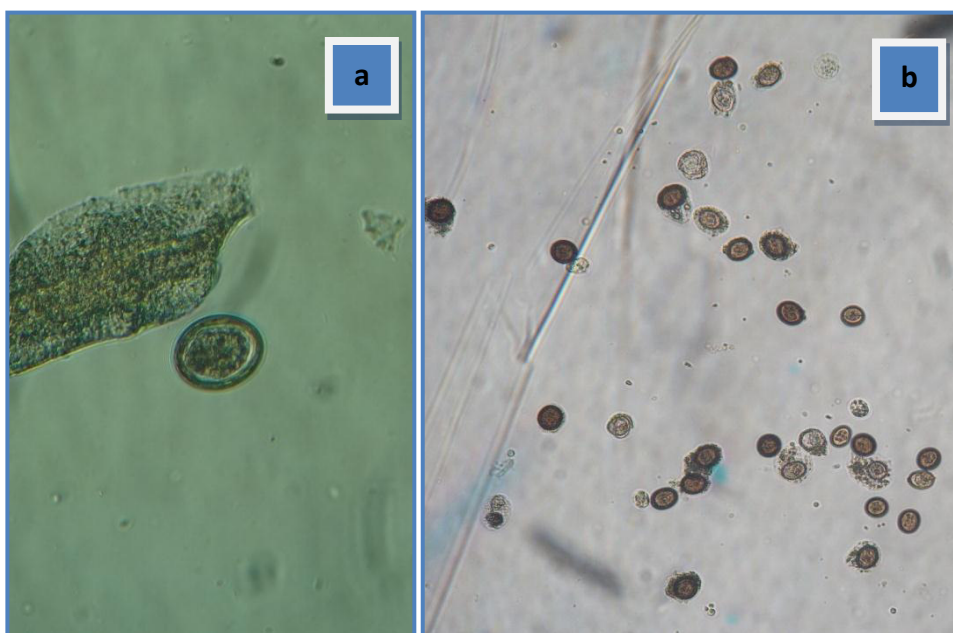


FIGURA 29. (a) Presencia de huevos inmaduros en sobrenadante de las tenias del perro EG071 tratado con proteína total; (b) presencia de huevos maduros en sobrenadante de perro control EG072.

TABLA 10. Perros inmunizados (n=12) contra *E. granulosus* usando diferentes antígenos

ID	Antígeno vacunado	Días Post – Infección	No. tenias totales	Presencia de huevos		Longitud promedio de tenias (mm)
				Si/No	Maduros/ inmaduros	
Primer Tiempo (1 perro/ grupo de tratamiento)						
EG059	Control	49	4400	Si	Maduros	2.3
EG061	E/S(PSC’s + tenia adulta)	49	1100	No	---	2.2
EG060	Proteína membrana (PSC’s + tenia adulta)	51	2619	No	---	3.5
EG067	Proteína total (tenia adulta)	51	3460	Si	Inmaduros	---*
Segundo Tiempo (1 perro/ grupo de tratamiento)						
EG070	Control	49	28333	Si	Maduros	---*
EG069	E/S(PSC’s + tenia adulta)	49	7250	No	---	2.6
EG068	Proteína membrana (PSC’s + tenia adulta)	53	7333	No	---	1.7
EG071	Proteína total (tenia adulta)	53	14000	Si	Inmaduro	2.3
Tercer Tiempo (1 perro/ grupo de tratamiento)						
EG072	Control	47	43000	Si	Maduros	2.4
EG073	E/S(PSC’s + tenia adulta)	47	19250	No	---	2.4
EG075	Proteína membrana (PSC’s + tenia adulta)	49	36750	No	---	2.4
EG074	Proteína total (tenia adulta)	49	37000	Si	Inmaduros	2.1

PSC's = Protoescolices

E/S = Excretorio/Secretorio

mm = milímetros

*Hubo pérdida de muestra, por tanto no se realizó las mediciones de las tenias de estos perros.

6.3.3 Procedimiento de Análisis e Interpretación

Al analizar los valores de la mediana de la carga parasitaria, se evidenció que los perros inmunizados con antígeno E/S (7250) y PM (7333), presentaron menor carga parasitaria en comparación a los perros control (28333) y a los perros inmunizados con proteína total (14000), como se muestra en la Tabla 11 y Figura 30, sin embargo las diferencias estadísticas de los valores de las medianas resultaron ser no significativas ($p > 0.05$), por el *test* no paramétrico de Kruskal - Wallis.

TABLA 11. Valores de la mediana de la carga parasitaria de perros inmunizados

TRATAMIENTO	MEDIANA	N	RANGO	MÍNIMO	MÁXIMO
CONTROL	28333	3	38600	4400	43000
E/S	7250	3	18150	100	19250
PM	7333	3	34131	2619	36750
PROTEÍNA TOTAL	14000	3	33540	3460	37000
TOTAL	10666	12	41900	1100	43000

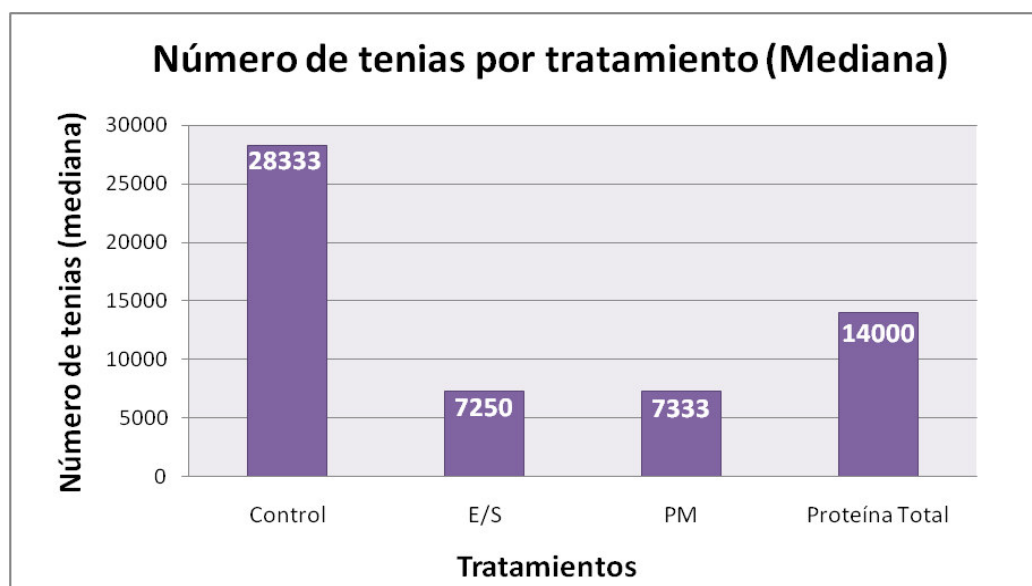


FIGURA 30. Carga parasitaria de perros inmunizados.

Por otro lado, se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) al evaluar por la Prueba de Fisher ($p = 0.006$) la presencia/ausencia de huevos en los perros inmunizados, mientras que al evaluar por K- Wallis el largo de las tenias de los perros, no se encontró diferencias significativas.

VII. DISCUSIÓN

El empleo de los medios de cultivo HAM F12 y MEM, para la obtención de antígeno E/S a partir de protoescolices, no aportó los nutrientes necesarios ya que carecen de galactosa, nutriente esencial para la formación de estructuras ricas en calcio como los corpúsculos calcáreos de los protoescolices (Reus *et al.*, 1992). Sin embargo HAM F12 resultó ser mejor en cuanto a la conservación de características morfológicas (Figura 21), ya que ésta última posee una mayor composición de sales inorgánicas (como sulfato cúprico, sulfato ferroso), ácido pirúvico, timidina, ácido linoleico y en especial de aminoácidos (como L-alanina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-prolina, L-serina), y una mayor concentración de glucosa (2%) en comparación al medio MEM (1%) (Manual SIGMA, 2012).

El medio HAM F12 suplementado con glucosa al 2%, glutamina al 0.5% y L-arginina al 0.5%, permitió mantener a los protoescolices por un periodo de 32 días (Figura 18 y 19), a diferencia de lo reportado por Herd *et al.*, (1975), Carmena *et al.*, (2002) y Carmena *et al.*, (2005), quienes lograron mantener a los protoescolices por periodos cortos de tiempo (7-10 días), empleando el Medio 199, PBS - Dextrosa al 10% y PBS - Glucosa al 10%, respectivamente. Sin embargo, Reus *et al.*, (1992) lograron una supervivencia de protoescolices que osciló entre los 60 y 85 días, pudiendo deberse a que no se suplementó el medio con todos los aminoácidos no-esenciales y sólo se utilizó L-arginina

al 0.5% (un aminoácido no esencial), mientras que Reus *et al.*, (1992) emplearon 5% de aminoácidos no-esenciales, pudiendo decir que la presencia de los demás aminoácidos no-esenciales en el medio son fundamentales en la supervivencia de los parásitos, ya que las condiciones de incubación fueron las mismas.

Una de las limitantes de este estudio fue la baja concentración de proteínas del antígeno E/S de PSC's (Tabla 3), lo cual también fue reportado por Reus *et al.*, (1992).

Por otro lado, para la obtención de antígeno E/S a partir de tenia adulta, el medio HAM F12 suplementado de la misma forma que el medio de PSC's, permitió una supervivencia de 15 días, en contraste a lo obtenido por Casavarilla *et al.*, (2004), Kumaratilake y Thompson, (1981) quienes lograron una supervivencia de no más de 7 días, al emplear el Medio 199 suplementado con glucosa al 4% y al 10 %, respectivamente.

En el aislamiento de proteínas de membrana de PSC's se obtuvo una mayor concentración de proteínas con Tritón x-114 al 1% (Sección 6.1.2.2) y un patrón de bandas más definidas (Figura 22) en comparación a lo obtenido por deoxicolato de sodio al 10%. Ésto es debido a que los detergentes iónicos, como el deoxicolato de sodio, a altas concentraciones desnaturalizan por completo las proteínas (Lodish *et al.*, 2006; Bhairi, 2001), pero empleados a bajas concentraciones presentan buenos resultados, como los reportados por Carol *et al.*, (1997) quienes extrajeron antígenos de superficie de protoescolices (PSC's) con el detergente MEGA 10 (detergente iónico) al 1%, y obtuvo una mejor solubilización de los mismos, con una menor proporción de PSC's desorganizados, a diferencia de lo obtenido al emplear mayores concentraciones del detergente MEGA 10.

No obstante, los detergentes no iónicos como el Tritón x-114, no desnaturalizan las proteínas y a altas concentraciones solubilizan las membranas biológicas y forman

micelas mixtas de detergente, fosfolípidos y proteínas integrales de membrana. A bajas concentraciones se unen a las regiones hidrófobas de la mayoría de las proteínas integrales de membrana y los hacen solubles en soluciones acuosas (Lodish *et al.*, 2006; Bhairi, 2001). Razones por las cuales se optó por emplear Tritón x-114 al 1% en lugar de deoxicolato de sodio al 10%, para la extracción de proteínas de membrana de tenia adulta y protoescólex.

Para la producción de antígeno total de tenia adulta, las condiciones empleadas para la sonicación de la misma resultaron adecuadas para obtener antígeno somático, ya que el perfil electroforético del mismo mostró un perfil de bandas definidas (Figura 26), lo cual demuestra que las proteínas a tales condiciones no fueron desnaturalizadas. Condiciones similares han sido aplicadas por Carmena *et al.*, (2005) y Casaravilla *et al.*, (2004) para propósitos de inmunodiagnóstico en perros contra *E. granulosus*.

Por tanto, las condiciones empleadas para la sonicación de tenias adultas en este presente trabajo, pueden ser utilizadas para futuras investigaciones similares o con diferentes propósitos.

En la caracterización de los antígenos inmunogénicos empleados se identificó 12 componentes proteicos del antígeno de E/S de PSC's, cuyos pesos moleculares están en un rango de 18 a 155 kDa (Figura 24 y Anexo 3), que es aproximado a lo encontrado por Carmena *et al.*, (2005) quienes identificaron siete componentes proteicos, que van desde 46 hasta 133 kDa.

En el caso del antígeno E/S de tenia adulta, se halló 11 componentes proteicos que van de 17 hasta 155 KDa (Figura 24 y Anexo 3), mientras que Herd *et al.*, (1975) identificaron más de 13 componentes proteicos que pueden ser las lipoproteínas de secreción de la glándula rostral descrita por Smyth (1964).

La diferencia del patrón electroforético obtenido a partir de los antígenos anteriormente mencionados, en comparación con otros trabajos, puede ser debido a diferencias de metodología, ya que la electroforesis es una técnica muy sensible y puede ser afectada por muchos factores experimentales como: la temperatura durante la polimerización, la corrida del gel, velocidad de la polimerización, niveles de catalizador, pureza del reactivo, tiempo de corrida, preparación y tipo de las muestras (INS, 2003).

Por otro lado, el número de bandas y los respectivos pesos moleculares encontrados en los antígenos de superficie de tenia y protoescoléx, extraídos bajo la metodología de Tritón x-114, no pueden ser comparados con otros trabajos por ser uno de los muy escasos trabajos que analizan el patrón electroforético de este tipo de antígenos.

En el caso del perfil electroforético del antígeno somático de tenia adulta se halló múltiples componentes proteicos, cuyos pesos moleculares van desde 7.70 a 166 KDa (Figura 26 y Anexo 5), pesos moleculares similares a los reportados por Toaleb *et al.*, (2011) cuyo rango estuvo entre 14 a 103 KDa.

Al evaluar el grado de protección de los antígenos empleados en los perros inmunizados, se encontró un grado de protección parcial en los perros inmunizados con antígeno metabólico (E/S) (Figura 30 y Tabla 11), que también ha sido reportado por Herd (1977) y Herd *et al.*, (1975), quienes encontraron que dicho antígeno induce inmunidad protectora en perros contra *E.granulosus* a diferencia del antígeno somático o estructural, y esto es debido a que el hospedador únicamente reconoce los antígenos somáticos cuando en la superficie del parásito se abre una brecha, ya sea mediante un proceso de reconocimiento inmune, potencialmente protector o a través de fracturas mecánicas (Rivas *et al.*, 1993).

Sin embargo, también se encontró que los perros inmunizados con antígeno de superficie (PM) también es inmunogénico (Figura 30 y Tabla 11), ya que induce una protección parcial ante la carga parasitaria y el desarrollo de huevos, como también ha sido reportado por Gemmell (1962), h *et al.*, (1936) y Movsesijan *et al.*, (1968).

Tomando como base las especulaciones de Smyth (1973), se puede sugerir, que los perros inmunizados con antígeno metabólico y antígeno de superficie, confieren protección ante la parasitemia y el desarrollo de huevos (Tabla 10), con respecto a los perros control, debido a que los antígenos estimulan una reacción antígeno –anticuerpo en la superficie rostral pudiendo inhibir el desarrollo somático y/o el desarrollo germinal, por interferir con el consumo de nutrientes esenciales.

Es importante destacar también que sólo los antígenos metabólicos y de superficie proporcionan una interface entre el parásito viable y su hospedador, esto significa que todos los mecanismos de evasión del parásito, y a su vez los mecanismos protectores del hospedador, deben actuar principalmente a través de las moléculas de dichos compartimientos (Rivas *et al.*, 1993).

Por otro lado, ninguno de los antígenos influyó en el tamaño de las tenias (Tabla 10), puesto que todas fueron similares, por tanto se puede decir que los antígenos empleados estimularon la respuesta inmune inhibiendo el desarrollo germinal de las tenias, mas no el desarrollo somático, puesto que Smyth (1971) y Armira (2004) evidenciaron que el control del desarrollo somático y diferenciación sexual son independientes.

La diferencia del grado de protección puede deberse también a la naturaleza del antígeno y la posible respuesta que se produjo luego de la inmunización intranasal. A pesar que en este trabajo no se ha evaluado a detalle la respuesta inmune de los caninos, Davis (2001) sugiere que los antígenos solubles-pequeños, como el antígeno metabólico (E/S) y el

antígeno de superficie (PM), en general son capaces de penetrar por el epitelio nasal e interactuar con las células dendríticas, macrófagos y linfocitos (intraepitelial y subnasal), drenar a la superficie del nódulo linfático cervical (localizados en el cuello) y a los nódulos linfáticos posteriores, induciendo una respuesta inmune mucosal local, provocando la síntesis de IgA, los cuales entran en circulación vía conducto torácico, y éstos se alojan en la lámina propia de la mucosa de sitios distantes, como el tracto intestinal, interfiriendo probablemente en el desarrollo del parásito. En contraste, los antígenos particulados como el antígeno total, pueden inducir tolerancia inmunológica.

Por otro lado, la reducción de la carga parasitaria y el bloqueo del desarrollo de huevos (Tabla 10), puede estar influenciado por el adyuvante Quil A y la vía de inoculación intranasal. Se ha reportado que el adyuvante Quil A potencia vacunas administradas por las vías mucosales (Aguilar, 2000), tiene la capacidad de modular el sistema inmune mediada por células, así como mejorar la producción de anticuerpos (Rajput *et al.*, 2007). En base a lo anterior, se puede sugerir que la concentración de Quil A a 50µg/ml otorga resultados favorables contra la equinococosis canina, ya que esta saponina tiene la ventaja de tener actividad adyuvante a bajas dosis (Rajput *et al.*, 2007).

Aunque en el presente estudio no se ha evaluado los niveles de IgA en el grupo de perros inmunizados, múltiples estudios empleando saponina como adyuvante y la administración intranasal, han dado resultado. Carol *et al.*, (1998) demostraron la generación de anticuerpos tanto a nivel circulante y local de IgA al inmunizar perros con antígenos de superficie de PSC's de *Echinococcus granulosus* e ISCOM's (como adyuvante) por vía intranasal e Igarashi *et al.*, (2010) provocando respuesta tanto humoral (IgG e IgA) como celular en ratones BALB/c, al emplear adyuvante Quil A y la inmunización por vía intranasal con proteínas recombinantes contra *Toxoplasma gondii*, además Hvalbye *et al.*, (1999) sugirieron un enlace celular entre el sitio de inducción nasal

y la mucosa distante al sitio efector, al estimular una marcada respuesta de IgA en heces, al inmunizar ratones por vía intranasal con *Streptococcus pneumoniae* inactivado por calor. La inmunización intranasal puede ser también un régimen efectivo para la inducción de antígenos específicos de células Th1 y Th2, los cuales impulsan la producción de IgA (Davis, 2001).

Por otra parte, la razón por la cual no se logró un mayor grado de protección o una protección total, puede ser debido a razones como la concentración de la dosis, la frecuencia de administración, el *background* genético del hospedero, o al uso de un cóctel de proteínas en lugar de proteínas puras y específicas, involucradas en la estimulación de una respuesta contra la equinocosis canina, enfoque empleado por Petavy *et al.*, (2008) y Zhang *et al.*, (2006) al emplear proteínas recombinantes de tenia adulta, pero sin éxito.

Asimismo, la falta de diferencia estadística significativa en el tamaño de las tenias y la carga parasitaria entre los grupos que recibieron tratamiento y los perros control, puede deberse al hecho de utilizar diferentes lotes de protoescolices al enfrentar a los perros como lo han reportado Zhang *et al.*, (2006) o a la falta de más animales en los grupos para tener más soporte estadístico.

En base a los resultados obtenidos se puede proponer que las vacunas eficaces contra la equinocosis canina pueden ser multivalentes, incluyendo antígenos metabólicos y de superficie, o se puede apuntar a realizar estudios futuros para determinar cuál de ambos antígenos estimula una mayor respuesta inmune contra *Echinococcus granulosus* y posteriormente establecer proteínas específicas involucradas a tal respuesta para su caracterización y obtención de vacuna recombinante.

VIII. CONCLUSIONES

- 1) El medio HAM F12 suplementado, es adecuado para la preparación de antígeno metabólico (E/S) de *E. granulosus*.
- 2) Los detergentes no iónicos como el Tritón x-114 al 1% son apropiados para la obtención de antígeno de superficie (PM) de *E. granulosus*.
- 3) Las condiciones de sonicación empleadas son óptimas para la obtención de antígeno somático de *E. granulosus*.
- 4) La inmunización intranasal y el adyuvante Quil A mejoran la resistencia contra la equinocosis canina al inducir la respuesta inmune local en el intestino delgado de perros.
- 5) La inmunización de antígenos metabólicos (E/S) y de superficie (PM), a bajas concentraciones son una buena alternativa para la protección de perros contra *E. granulosus*.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar JC. 2000. Adyuvantes vacunales: estado actual y nuevas tendencias. *Biotecnología Aplicada*, 17: 147-160.

Armira Camey, Heber Jonatan. 2004. Evaluación de tres métodos de diagnóstico para la identificación de huevos de *Echinococcus sp.*, en heces fecales de perros provenientes del departamento de Chimaltenango. Asesores: Manuel Rodríguez Zea, Carlos Camey Rodas, Heliodoro García Lemus. Tesis Título Profesional. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Guatemala. 64p.

Bhairi Srirama. 2001. Detergents: A guide to the properties and uses of detergents in biological systems. 2nd ed. Calbiochem-Novabiochem Corporation. 43p.

Billen F, Peeters D, Dehard S, Day MJ, Clercx C. 2006. Distribution of leucocyte subsets in the canine pharyngeal tonsil. *J Comp Pathol*, 135: 63-73.

Camicia, Federico. 2011. Caracterización de transportadores de aminoácidos en *Echinococcus granulosus*. Asesora: Mara Cecilia Rosenzvit. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Argentina. 139p.

Cardona GA, Carmena D. 2012. A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. *Vet Parasitol*. 6527: 23p.

Carmena D, Benito A, Martinez J, Guisantes JA. 2002. Preliminary study of the presence of antibodies against excretory-secretory antigens from protoscoleces of *Echinococcus granulosus* in dogs with intestinal echinococcosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100: 311-317.

Carmena D, Martinez J, Benito A, Guisantes JA. 2005. Shared and non-shared antigens from three different extracts of the metacestode of *Echinococcus granulosus*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 100: 861-867.

Carol H, Nieto A, Villacres-Eriksson M, Morein B. 1997. Intranasal immunization of mice with *Echinococcus granulosus* surface antigens iscoms evokes a strong immune response, biased towards glucidic epitopes. Parasite Immunol, 19: 197-205.

Carol H, Nieto A. 1998. A mucosal IgA response, but no systemic antibody response, is evoked by intranasal immunisation of dogs with *Echinococcus granulosus* surface antigens iscoms. Vet Immunol Immunopathol, 65: 29-41.

Casaravilla C, Iborra F, Sim RB, Ferreira F, Díaz A. 2004. Unique precipitation and exocytosis of a calcium salt of myo-inositol hexakisphosphate in larval *Echinococcus granulosus*. J Cell Biochem. 93(6):1272-81.

Chabalgoity J, Moreno M, Carol H, Dougan G, Hormaeche C. 2000. Salmonella typhimurium as a basis for a live oral *Echinococcus granulosus* vaccine. Vaccine, 19 (4-5): 460-469.

Chabalgoity JA, Harrison JA, Esteves A, Demarco de Hormaeche R, Ehrlich R, Khan CM. 1997. Expression and immunogenicity of an *Echinococcus granulosus* fatty acid-binding protein in live attenuated *Salmonella* vaccine strains. Infect Immun, 65: 2402-2412.

Craig PS, McManus DP, Lightowers MW, Chabalgoity JA, Garcia HH, Gavidia CM. 2007. Prevention and control of cystic echinococcosis. Lancet Infect Dis. 7(6): 385-94.

Davis SS. 2001. Nasal vaccines. Adv Drug Deliv Rev, 51: 21-42.

Delgado, Rosa. 2009. Hidatidosis una Realidad: Pasado y Presente. Sistema de Revisiones en Investigación. Veterinaria de San Marcos. 11p.

Deplazes P, Thompson RC, Constantine CC, Penhale WJ. 1994. Primary infection of dogs with *Echinococcus granulosus*: systemic and local (Peyer's patches) immune responses. Vet Immunol Immunopathol, 40: 171-184.

Eckert MA, Gemmell FX, Meslin, Pawłowski ZS. 2001. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern. World Organization for Animal Health (Office International des Epizooties) and World Health Organization. ISBN, 92: 9044-90522.

García JL, Navarro IT, Biazzone L, Freire RL, da Silva Guimaraes Junior J, Cryssafidis AL. 2007. Protective activity against oocyst shedding in cats vaccinated with crude rhoptry proteins of the *Toxoplasma gondii* by the intranasal route. Vet Parasitol, 145: 197-206.

Gavidia CM y De la Torre EN. 2002. Estandarización de un método inmunodiagnóstico para la infección por *Echinococcus granulosus* en perros y su utilidad en las comunidades campesinas de Yanahuanca. Serie informes técnicos nº6. 30p.

Gavidia CM, González AE, Lopera L, Jayashi C, Angelats R, Barron EA. 2009. Evaluation of nitazoxanide and oxfendazole efficacy against cystic echinococcosis in naturally infected sheep. Am J Trop Med Hyg. 80(3): 367-72.

Gemmell MA. 1962. Natural and acquired immunity factors interfering with development during the rapid growth phase of *Echinococcus granulosus* in dogs. Immunology, 5: 496-503.

Herd RP, Chappel RJ, Biddell D. 1975. Immunization of dogs against *Echinococcus granulosus* using worm secretory antigens. Int J Parasitol, 5: 395-399.

Herd RP. 1977. Resistance of dogs to *Echinococcus granulosus*. Int J Parasitol, 7: 135-138.

- Howard RJ, Barnwell JW. 1984. Solubilization and immunoprecipitation of ¹²⁵I-labelled antigens from *Plasmodium knowlesi* schizont-infected erythrocytes using non-ionic, anionic and zwitterionic detergents. *Parasitology*. 88: 27-36.
- Hvalbye BK, Aaberge IS, Lovik M, Haneberg B. 1999. Intranasal immunization with heat-inactivated *Streptococcus pneumoniae* protects mice against systemic pneumococcal infection, *Infect. Immun.* 67: 4320-4325.
- Igarashi M, Zulpo DL, Cunha IA, Barros LD, Pereira VF, Taroda A. 2010. *Toxoplasma gondii*: humoral and cellular immune response of BALB/c mice immunized via intranasal route with rTgROP2. *Rev Bras Parasitol Vet*, 19: 210-216.
- INS. 2003. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Elaborado por Carlos Yábar Varas. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. 69p.
- Kumaratilake LM, Thompson RC. 1981. Maintenance of the life cycle of *Echinococcus granulosus* in the laboratory following *in vivo* and *in vitro* development. *Z Parasitenkd*, 65:103-106.
- Larrieu E, Del Carpio M, Salvitti J, Mercapide C, Sustersic J, Panomarenko H. 2004. Ultrasonographic diagnosis and medical treatment of human cystic echinococcosis in asymptomatic school age carriers: 5 years of follow-up. *Acta Tropica*. 91(1): 5-13.
- León Pérez, Celso Roberto. 2007. Proyecto de control de hidatidosis en el Perú por vigilancia epidemiológica. Asesor: César Naquira Velarde. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina. Perú. 140p.
- Lightowlers MW, Flisser A, Gauci CG, Heath DD, Jensen O, Rolfe R. 2000. Vaccination against cysticercosis and hydatid disease. *Parasitol Today*. 16(5): 191-196.

Lightowlers MW, Heath DD. 2004. Immunity and vaccine control of *Echinococcus granulosus* infection in animal intermediate hosts. *Parassitologia*. 46(1-2): 27-31.

Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell. 2006. *Biología Celular y Molecular*. 5ta ed. Editorial Panamericana. 284p.

Manual SIGMA, 2012. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-formulations/f-12-ham.html>

McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. 2003. Echinococcosis. *Review Academic*. 362(9392): 1295-304.

Molinari JL, Tato P, Lara Aguilera R, White AC. 1993. Effects of serum from neurocysticercosis patients on the structure and viability of *Taenia solium* oncospheres. *J Parasitol*. 79(1): 124-7.

Mondragon de la Peña, María del Carmen. 2003. *Echinococcus granulosus*: Participación de citocinas en la regulación de la Respuesta Inmune en la Hidatidosis experimental. Asesor: Dra. Cristina Rodríguez Padilla. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. 92p.

Moro PL, McDonald J, Gilman RH, Silva B, Verastegui M, Malqui V. 1997. Epidemiology of *Echinococcus granulosus* infection in the central Peruvian Andes. *Bull World Health Organ*, 75(6): 553-61.

Movsesijan M, Sokolic A, Mladenovic Z. 1968. Studies on the immunological potentiality of irradiated *Echinococcus granulosus* forms: immunization experiments in dogs. *Br. Vet. J.*, 124: 425-432.

Mowat M. A. and Reid G. 1995. Induction of Immune Responses. Preparation of Immune Stimulating Complexes (ISCOMs) as Adjuvants. Current Protocols in Immunology. 2.11.1-2.11.12.

OIE, 2005. Institute for International Cooperation in Animal Biologics. Echinococcosis. Iowa2005 Available from: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/echinococcosis.pdf>

OIE, 2008. Institute for International Cooperation in Animal Biologics. Echinococcosis. Available from: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/echinococcosis.pdf>.

Oyenard Pérez, Gonzalo. 2009. Caracterización funcional de la proteína tipo Kunitz de *Echinococcus granulosus* EgKu-5. Asesora: Cecilia Fernández. Tesis de Licenciatura. Universidad de la República, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Uruguay. 67p.

Petavy AF, Hormaeche C, Lahmar S, Ouhelli H, Chabalgoity A, Marchal T. 2008. An Oral Recombinant Vaccine in Dogs against *Echinococcus granulosus*, the Causative Agent of Human Hydatid Disease: A Pilot Study. PLoS Negl Trop. 2(1): 125- 135.

Rajput ZI, Hu SH, Xiao CW, Arijó AG. 2007. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. J Zhejiang Univ Sci B, 8: 153-161.

Reus Sánchez, Fernando. 1992. Caracterización, purificación y localización inmunohistoquímica de los antígenos mayoritarios de *Echinococcus granulosus*. Antígeno 5 y antígeno B. Asesora: Carmen Muñoz Batet. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona. 325p.

Reyes MM, Taramona CP, Saire Mendoza M, Gavidia CM, Barron E, Boufana B. 2012. Human and canine echinococcosis infection in informal, unlicensed abattoirs in Lima, Perú. PLoS Negl Trop Dis. 6: 1462-1470.

Rivas López M. 1993. Parasitología Molecular. Nuevas Tendencias. R.B. Servicios Editoriales S. A. España. 786p.

Rosales S, Gavidia CM, Lopera L, Barrón E, Ninaquispe B, Calderon C. 2008. Obtaining of *Echinococcus granulosus* in experimentally infected dogs with protoscolices of hydatid cysts. Rev Investigaciones Veterinarias del Perú.19(1): 37-42.

Rosenzvit MC, Camicia F, Kamenetzky L, Muzulin PM, Gutierrez AM. 2006. Identification and intra-specific variability analysis of secreted and membrane-bound proteins from *Echinococcus granulosus*. Parasitol Int. 55: S63-67.

Rossi A, Marques JM, Gavidia CM, González AE, Carmona C, Garcia HH. 2012. *Echinococcus granulosus*: different cytokine profiles are induced by single versus multiple experimental infections in dogs. Exp Parasitol, 130: 110-115.

Sánchez E, Cáceres O, Naquira C, Garcia D, Patino G, Silvia H. 2010. Molecular characterization of *E. granulosus* from Peru by sequencing of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene. Mem Inst Oswaldo Cruz.105: 806-810.

Santos FN, Borja Cabrera GP, Miyashiro LM, Grechi J, Reis AB, Moreira MA. 2007. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. Vaccine, 25: 6176-6190.

Santos AL, d'Avila-Levy CM, Dias FA, Ribeiro RO, Pereira FM, Elias CG. 2006. *Phytomonas serpens*: cysteine peptidase inhibitors interfere with growth, ultrastructure and host adhesion. Int J Parasitol. 36(1): 47-56.

Sato H, Kamiya M. 1990. Extraintestinal strobilar development of immature *Echinococcus multilocularis* in laboratory rodents following intratracheal inoculation of the protoscoleces. Int J Parasitol. 20(5):689-92.

- Smyth JD. 1964. Natural and Experimental Hosts of *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*, with Comments on the Genetics of Speciation in the Genus *Echinococcus*. *Parasitology*, 54: 493-514.
- Smyth JD. 1971. Development of monozoic forms of *Echinococcus granulosus* during *in vitro* culture. *Int J Parasitol*, 1:121-124.
- Smyth JD. 1973. Some interface phenomena in parasitic protozoa and platyhelminths. *Can J Zool*, 51: 367-377.
- Sun HX, Xie Y, Ye YP. 2009. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine* 27: 1787-1796.
- Toaleb NI, Derbala AA, Abdel Rahman HE. 2011. Comparative Diagnostic Evaluation of Crude and Isolated Fractions of *Echinococcus granulosus* in Dogs. *Global Veterinaria* 7(6): 587-592.
- Torgerson PR, Carmona C, Bonifacino R. 2000. Estimating the economic effects of cystic echinococcosis. Uruguay, a developing country with upper-middle income. *Ann Trop Med Parasitol*, 94(7): 703-13.
- Torgerson PR. 2008. Dogs, vaccines and *Echinococcus*. Ross University School of Veterinary Medicine, PO Box 334, Basseterre, St Kitts, West Indies. Elsevier. 3p.
- Turner EL, Berberian DA, Dennis EW. 1936. The production of artificial immunity in dogs against *Echinococcus granulosus*. *J. Parasitol*; 22: 14-28.
- Xiao N, Qiu J, Nakao M, Li T, Yang W, Chen X, Schantz PM, Craig PS. 2006. *Echinococcus shiquicus*, a new species from the Qinghai-Tibet plateau region of China: Discovery and epidemiological implications. *Parasitol. Int.*, 55: S233–236.

Zhang W, Li J, McManus DP. 2003. Concepts in Immunology and Diagnosis of Hydatid Disease. Clin Microbiol Rev.16(1): 18-36.

Zhang W, Ross AG, McManus DP. 2008. Mechanisms of immunity in hydatid disease: implications for vaccine development. J Immunol. 181(10): 6679-85.

Zhang W, Zhang Z, Shi B, Li J, You H, Tulson G. 2006. Vaccination of dogs against *Echinococcus granulosus*, the cause of cystic hydatid disease in humans. J Infect Dis,194 (7): 966-74.

X. ANEXOS

ANEXO 1. Constancia de Autorización del Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA)



Lima, 28 de marzo de 2011

Constancia de Autorización Ética N°. 008

Visto la importancia y posible repercusión en la Salud Pública del proyecto presentado por el PhD César Gavidia Chucán y considerando que en el mismo se han tomado en cuenta los aspectos de Ética y Bienestar Animal, el CEBA de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos expide la presente Constancia de Autorización Ética al protocolo: "*Evaluación de proteínas inmunogénicas contra *Ecchinococcus granulosus* en perros infectados experimentalmente*".

Atentamente,



Felipe San Martín H.
PRESIDENTE DEL CEBA

ANEXO 2. Pesos moleculares del carril 1 (17 bandas) y 2 (10 bandas) del gel No.1, donde se muestran las bandas proteicas del antígeno de PM de PSC extraídas con Tritón x-114 y deoxicolato de sodio, respectivamente.

Rf₁ Carril 1	Ecuación Rf₁	ANTILOG= P. Mol.	Rf₂ Carril 2	Ecuación Rf₂	ANTILOG=P.Mol.
0.11	4.86	128.614	0.16	4.66	106.15
0.19	4.54	93.400	0.23	4.41	82.18
0.26	4.28	72.310	0.35	3.90	49.26
0.31	4.09	59.681	0.34	3.96	52.51
0.35	3.90	49.257	0.45	3.51	33.55
0.39	3.77	43.340	0.47	3.45	31.47
0.42	3.64	38.134	0.52	3.26	25.98
0.48	3.39	29.523	0.61	2.87	17.70
0.52	3.26	25.977	0.89	1.79	5.96
0.56	3.07	21.440	0.90	1.72	5.59
0.63	2.81	16.599			
0.65	2.75	15.570			
0.69	2.55	12.851			
0.73	2.43	11.307			
0.81	2.11	8.211			
0.87	1.85	6.357			
0.95	1.53	4.617			

P.Mol. = Peso molecular

ANEXO 3. Pesos moleculares del carril 1 (12 bandas) y 2 (11 bandas) del gel No.2 donde se muestran las bandas proteicas del antígeno E/S de PSC y tenia adulta, respectivamente.

Rf₁ Carril 1	Ec. Rf₁	Antilog = P.MOL.	Rf₂ Carril 2	Ec. Rf₂	Antilog = P.MOL.
0.06	5.05	155.83	0.03	5.18	177.10
0.08	4.98	146.17	0.13	4.79	120.64
0.13	4.79	120.64	0.16	4.66	106.15
0.16	4.66	106.15	0.24	4.34	77.09
0.18	4.60	99.57	0.34	3.96	52.51
0.23	4.41	82.18	0.53	3.19	24.37
0.31	4.09	59.68	0.61	2.87	17.70
0.32	4.03	55.98	0.66	2.68	14.60
0.45	3.51	33.55	0.73	2.43	11.31
0.48	3.39	29.52	0.77	2.23	9.33
0.53	3.19	24.37	0.84	1.98	7.22
0.60	2.94	18.86			

P.Mol.= Peso molecular

ANEXO 4. Pesos moleculares del carril 1 (18 bandas) gel No.3, donde se muestran las bandas proteicas del antígeno de PM de tenia adulta.

Rf₁ Carril 1	Ecuación RF₁	ANTILOG= P.Mol.
0.06	5.05	155.83
0.10	4.92	137.11
0.11	4.86	128.61
0.15	4.73	113.16
0.18	4.60	99.57
0.26	4.28	72.31
0.27	4.22	67.83
0.35	3.90	49.26
0.44	3.58	35.77
0.47	3.45	31.47
0.52	3.26	25.98
0.56	3.07	21.44
0.61	2.87	17.70
0.63	2.81	16.60
0.66	2.68	14.60
0.69	2.55	12.85
0.74	2.36	10.61
0.87	1.85	6.36

P.Mol.= Peso molecular

ANEXO 5. Pesos moleculares del carril 1 (14 bandas) del gel No 4, donde se muestran las bandas proteicas del antígeno total de tenia adulta.

Rf₁ Carril 1	Ecuación Rf₁	ANTILOG= P.Mol.
0.05	5.11	166.13
0.10	4.92	137.11
0.13	4.79	120.64
0.19	4.54	93.40
0.21	4.47	87.61
0.26	4.28	72.31
0.34	3.96	52.51
0.45	3.51	33.55
0.48	3.39	29.52
0.52	3.26	25.98
0.63	2.81	16.60
0.65	2.75	15.57
0.68	2.62	13.70
0.82	2.04	7.70

P.Mol. = Peso molecular

Anexo 6. Cálculos para la preparación de Inóculos empleando adyuvante Quil A.

a) Preparación del inóculo con el antígeno E/S y Quil A:

Para tenia adulta:

$$\begin{array}{rcl} 318.2\mu\text{g E/S de tenia adulta} & \text{-----} & 1\text{ml} \\ 200\mu\text{g E/S de tenia adulta} & \text{-----} & X \\ & & X=0.63\text{ml} \end{array}$$

Para protoescólex:

$$\begin{array}{rcl} 216.3\mu\text{g E/S de protoescólex} & \text{-----} & 1\text{ml} \\ 200\mu\text{g E/S de protoescólex} & \text{-----} & X \\ & & X=0.92\text{ml} \end{array}$$

Total de volumen a inmunizar de E/S:

$$0.63\text{ml E/S tenia adulta} + 0.92\text{ml E/S protoescólex} = 1.55\text{ml}$$

Cantidad de Quil A para antígeno E/S de fase adulta y larval:

$$\begin{array}{l} X \cdot (1\text{mg/ml Quila-A}) = (50\mu\text{g/ml}) \cdot (1.55\text{ml} + X) \\ X=81.6\mu\text{l Quil A} \end{array}$$

b) Preparación del inóculo con el antígeno de superficie y Quil A:

Para tenia adulta:

$$\begin{array}{rcl} 390.6\mu\text{g P. M. de tenia adulta} & \text{-----} & 1\text{ml} \\ 200\mu\text{g P. M. de tenia adulta} & \text{-----} & X \\ & & X=0.51\text{ml} \end{array}$$

Para protoescólex:

$$\begin{array}{rcl} 405.4\mu\text{g P. M. de protoescólex} & \text{-----} & 1\text{ml} \\ 200\mu\text{g P. M. de protoescólex} & \text{-----} & X \\ & & X=0.49\text{ml} \end{array}$$

Total de volumen a inmunizar de proteínas de membrana:

$$0.51\text{ml PM de tenia adulta} + 0.49\text{ml PM de protoescólex} = 1\text{ml}$$

Cantidad de Quil A para antígeno de superficie (PM) de fase adulta y larval:

$$X \cdot (1\text{mg/ml Quila-A}) = (50\mu\text{g/ml}) \cdot (1\text{ml} + X)$$

$$X = 52.6 \mu\text{l Quil A}$$

c) Preparación del inóculo con el antígeno total y Quil A:

De tenia adulta:

$$305.7\mu\text{g antígeno total de tenia adulta} \text{ ----- } 1\text{ml}$$

$$200 \mu\text{g antígeno total de tenia adulta} \text{ ----- } X$$

$$X = 0.65\text{ml}$$

Cantidad de Quil A para antígeno total de fase adulta:

$$X \cdot (1\text{mg/ml Quil A}) = (50\mu\text{g/ml}) \cdot (0.65\text{ml} + X)$$

$$X = 34.2 \mu\text{l Quil A}$$